

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 009**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2008 E 08736491 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2013 EP 2150275**

54 Título: **Líneas celulares madre derivadas de embriones de pato para la producción de vacunas virales**

30 Prioridad:

24.04.2007 EP 07300979

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

07.02.2014

73 Titular/es:

**VALNEVA (100.0%)
70, rue Saint-Jean de Dieu
69007 Lyon, FR**

72 Inventor/es:

**GUEHENNEUX, FABIENNE;
MOREAU, KARINE;
ESNAULT, MAGALI y
MEHTALI, MAJID**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 442 009 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

Líneas celulares madre derivadas de embriones de pato para la producción de vacunas virales

La presente invención se refiere al desarrollo y a la fabricación de vacunas virales. En particular, la invención se refiere al campo de la producción industrial de vectores y vacunas virales, más específicamente al uso de líneas celulares de pato derivadas de células madre embrionarias que están exentas de retrovirus endógenos de aves, para la producción de vectores y virus virales. La invención es particularmente útil para la producción industrial de vacunas virales para prevenir la infección viral de seres humanos y animales.

Antecedentes

Las vacunas reducen y previenen eficazmente la muerte y enfermedades de muchas infecciones virales tales como, por ejemplo, gripe, sarampión, paperas, viruela, fiebre amarilla.

Muchas vacunas virales se producen actualmente en huevos embrionados de pollo o en fibroblastos primarios de embriones de pollo aislados a partir de embriones de pollo. Sin embargo, la producción de vacunas se ha visto ocasionalmente complicada por una contaminación inadvertida con agentes adventicios que pueden proceder de sustratos de células de aves utilizados para propagar cepas de vacunas. De hecho, la actividad de la transcriptasa inversa (RT – siglas en inglés), una indicación de la presencia de retrovirus, fue detectada en vacunas atenuadas vivas, derivadas de células de pollo, que incluyen las producidas por fabricantes europeos y de Estados Unidos de América para la fiebre amarilla, sarampión y paperas (Hussain et al., 2003, J. Virol 77:1105-1111; Johnson y Heneine, 2001, J. Virol. 75:3605-3612). Investigaciones del origen de la actividad de la RT en esas vacunas encontraron evidencia de partículas que contenían ARN procedente de virus de la leucosis aviar endógeno (ALV-E) y virus aviar endógeno (EAV) (Johnson y Heneine, 2001, J. Virol. 75:3605-3612; Tsang et al., 1999. J. Virol 73:5843-5851; Weissmahr et al., 1997, J. Virol. 71:3005-3012).

Tanto ALV-E como EAV son miembros de familias de retrovirus endógenos, presentes en la línea germinal del pollo. ALV-E son expresados a partir de loci *ev*, que son elementos provirales hereditarios. Basado en sus secuencias de la envoltura, los ALV-E se diferencian de subgrupos A a D y J de ALV, que son infecciones adquiridas de forma exógena. Mientras que ALVs exógenos provocan varias enfermedades neoplásicas tales como miocarditis y osteopetrosis en pollos infectados, no se conoce que los ALV-E sean patógenos para los pollos. La carencia de un potencial oncogénico con infecciones por ALV-E puede ser atribuida a la ausencia tanto de una actividad de oncogen como de potenciador viral en la repetición terminal larga (LTR – siglas en inglés) endógena. Más de 20 loci *ev* diferentes han sido identificados en pollos White Leghorn (*ev*-1 a *ev*-22). Las designaciones de los loci *ev* se asignan en el orden descubierto y se clasifican fenotípicamente con respecto a los productos génicos que expresan y a su capacidad de generar partículas infecciosas. Fenotipos de ALV-E conferidos por loci *ev* oscilan desde partículas infecciosas estructural y enzimáticamente completas a estructural o enzimáticamente defectuosas (RT) a expresión de la proteína viral no detectable. La mayoría de los loci *ev* son estructuralmente incompletos y, por lo tanto, no codifican todas las secuencias necesarias para la producción de partículas de virus infecciosos. La raza de pollos denominada *ev*-0 ha sido obtenida mediante la cría de modo que sea resistente a ALV-E. Pollos de la línea 0 carecen de loci *ev* (es decir *ev*-0), pero están presentes secuencias provirales en pollos de la línea 0 del genoma (Dunwiddie y Faras, 1985, Proc Natl. Acad. Sci USA, 82: 5097-5101).

Poco se conoce sobre la familia de EAV, que es distinta, pero que está relacionada con la familia de ALV. Elementos de EAV están presentes en al menos 50 copias por cada genoma del pollo. Sin embargo, ninguna de las secuencias de EAV conocidas representa genomas retrovirales de longitud completa e intactos, y todavía no se han identificado aislados de EAV infecciosos. Sin embargo, EAV ha demostrado expresarse altamente en células embrionarias derivadas del género aviar, Gallus. Weissmahr et al., (1997, J. Virol 71:3005-3012) han demostrado que partículas procedentes de la familia de retrovirus endógenos EAV son lo más probablemente responsables de una gran parte de la actividad de la RT asociada a las partículas, encontrada en los sobrenadante de fibroblastos embrionarios de pollo cultivados.

El riesgo de una transmisión inadvertida es particularmente elevado para la vacuna de virus atenuados vivos, dado que no pueden ser sometidos a un proceso de inactivación, y la mayoría de ellos son inyectados en el ser humano, por lo tanto pasando mecanismos de protección inmune no específicos. Así, con el fin de garantizar una seguridad de las vacunas para uso animal y humano, los sustratos celulares para la producción de vacunas han de ser ahora sometidos a ensayo en cuanto a la presencia de retrovirus competentes para la replicación que podrían ser transmitidos a hospedadores animales o humanos durante la inmunización (Series de informes técnicos de la OMS, 1994).

Por otra parte, sistemas de producción de huevos embrionados de pollo y fibroblastos primarios de embriones de pollo están asociados con varias limitaciones serias, que incluyen:

- un proceso de fabricación prolongado, pesado y consumidor de reservas que requiere la adquisición y el control de calidad de grandes cantidades de huevos o CEFs para cada una de las campañas de producción individuales;
- la necesidad en muchos casos de utilizar costosos embriones de pollo libres de patógenos específicos (SPF – siglas en inglés);
- los riesgos de un suministro insuficiente de huevos en los casos de infecciones epidémicas en bandadas de pollos donantes;
- los costes inflacionistas asociados con el uso de sueros bovinos que proceden de países exentos de encefalopatía espongiforme bovina (BSE – siglas en inglés);
- la incapacidad de utilizar huevos para la propagación de virus que son altamente virulentos y letales para los pollos.

Por lo tanto, existe una necesidad urgente de mejorar las actuales tecnologías de producción de vacunas virales basadas en huevos o fibroblastos embrionarios de pollo. El desarrollo de plataformas para el cultivo de células como una alternativa a los sistemas de producción de huevos y CEF para la fabricación de vacunas virales es probablemente la solución más rápida y prometedora para superar los cuellos de botella de producción de vacunas y las restricciones de tiempo actuales. Además de ello, el uso de líneas celulares para la fabricación de vacunas virales, en lugar de plataformas de huevos o CEF, tendrían las siguientes ventajas adicionales en relación con la seguridad de la vacuna: ningún aditivo antibiótico presente en la formulación de la vacuna; no se necesita conservante tóxico alguno (tal como tiomersal); niveles reducidos de endotoxina, ningún caso de alergia a los huevos; sin riesgo de agente adventicio/BSE por parte del cultivo celular en medios exentos de proteínas y suero; mayor pureza de la preparación de la vacuna de virus.

Ejemplos de líneas celulares para la producción de vacunas virales son MDCK (células derivadas del riñón de perro Madin-Darby), PerC6 (células derivadas de células de la retina embrionaria humana, genéticamente modificadas al insertar los genes E1 procedentes del adenovirus humano tipo 5) desarrolladas por CRUCCELL (Holanda), VERO (células derivadas de células epiteliales del riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) aislado en la Universidad Chiba, en Chiba, Japón), BHK21 (células inmortalizadas de células de riñón de hámster bebé). Ninguna de las líneas celulares disponibles cumple todos los requisitos médicos, reguladores e industriales. Por ejemplo, la mayoría de estas líneas celulares son tumorigénicas y existe una importante preocupación reguladora sobre el uso de células tumorigénicas para la producción de vacunas humanas; por lo tanto, hoy en día las autoridades reguladoras son reacias a aprobar sustratos de células tumorigénicas para producir vacunas en masa. Además, algunas de estas líneas celulares son dependientes de anclaje, lo que constituye una importante barrera para la ampliación industrial de la producción de vacunas.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar líneas celulares independientes de anclaje, libres de replicación competente de retrovirus, que sean no tumorigénicas y que sean conformes industrialmente, que sean susceptibles a infección con una amplia gama de virus. Este es el fin de la presente invención.

Así, el autor de la invención se ha aprovechado de su experiencia en biología aviar y en células madre embrionarias (ES – siglas en inglés) aviares para abordar el desarrollo de nuevas líneas celulares de pato estables que permitan la replicación eficaz de un gran grupo de vacunas y candidatos de vacunas humanos y veterinarios. Adaptando un procedimiento de su propiedad (véanse los documentos WO 03/076601 y WO 05/007840), el autor de la invención fue capaz de generar una serie de líneas celulares de pato bien caracterizadas y documentadas (es decir, las células dEBx®) que se derivan de células ES de pato, sin etapas de inmortalización genética, química o viral y que no producen retrovirus en cultivo competentes para la replicación.

Descripción

La presente invención proporciona un procedimiento para obtener líneas celulares aviares diploides continuas, denominadas EBx, derivadas de células madre embrionarias (ES) aviares, en donde dichas líneas celulares aviares no producen partículas de retrovirus endógenos competentes para la replicación.

Las líneas celulares obtenidas mediante el procedimiento de la invención son “continuas”, ya que tienen las características de ser cultivadas in vitro a lo largo de un período prolongado de tiempo. Ventajosamente, las células son capaces de proliferar durante al menos 50 generaciones, al menos 75 generaciones, al menos 100 generaciones, al menos 125 generaciones, al menos 150 generaciones, al menos 175 generaciones, al menos 200 generaciones, al menos 250 generaciones. Las 250 generaciones no constituyen un límite de tiempo, dado que las células obtenidas siguen siendo vivas y siguen siendo capaces de ser pasadas para pasajes adicionales. Sin estar ligados por una teoría, se postula que las células se pueden cultivar “continuamente”, en tanto que telomerasa sea

expresada por parte de las células. De hecho, se asume que el alto nivel de expresión de telomerasa de células aviares obtenidas mediante el procedimiento de la invención es el responsable de la estabilidad genética (es decir, células aviares obtenidas mediante el procedimiento de la invención son diploides) y el desarrollo celular continuo.

5 Por “pasaje” se quiere dar a entender la transferencia o trasplante de células, con o sin dilución, desde un recipiente de cultivo a otro. Se entiende que en cualquier instante en el que las células son transferidas de un recipiente a otro se puede perder una determinada parte de las células y, por lo tanto, puede producirse una dilución de células, ya sea deliberada o no. Este término es sinónimo al término “sub-cultivo”. El número de pasajes es el número de veces que las células en el cultivo, que se desarrollan en suspensión o en adherencia, han sido sub-cultivadas o se han hecho pasar a un nuevo recipiente. Este término no es sinónimo a duplicación de la población o generación, que es 10 el tiempo que necesita una población de células para replicarse una vez; es decir, aproximadamente el tiempo para que cada una de las células de una población se replique. Por ejemplo, células ES aviares de la etapa a) de la invención tienen un tiempo de duplicación de la población (PDT – siglas en inglés) de alrededor de > 40 horas. Las células EBx aviares, obtenidas mediante el procedimiento de la invención, tienen un PDT de alrededor de < 30 horas; habitualmente, para células EBx®, existe un pasaje cada 3 generaciones.

15 Por “diploide” se quiere dar a entender que las células de la invención tienen dos copias (2n) de cada uno de los cromosomas, habitualmente uno de la madre y otro del padre.

El hecho de que líneas celulares EBx® aviares obtenidas mediante el procedimiento de la invención sean continuas y diploides (es decir, sean genéticamente estables) constituye una característica notable y única, dado que estos 20 términos son habitualmente antagonistas. Por lo tanto, células cancerígenas y/o células inmortalizadas obtenidas mediante modificación química, física (radiación UV, rayos X o irradiación g, ...) o modificación genética (transformación del virus, sobre-expresión de oncogenes, ...) son células continuas, dado que son capaces de replicarse indefinidamente en el cultivo, pero no son genéticamente estables, ya que exhiben cariotipos poliploides. Por otra parte, células primarias tales como fibroblastos embrionarios de pollo, MRC5, WI38, que son células no transformadas, no son continuas, dado que tienen un período de vida finito después de unas pocas generaciones, 25 pero son células genéticamente estables (es decir, diploides).

En la presente invención, las expresiones “línea celular” y “células” se utilizarán de manera indistinta.

El término “aviar”, “pájaro”, “aves” o “ave”, tal como se utiliza en esta memoria, pretende tener el mismo significado y se utilizará de forma indistinta. “Pájaros” se refiere a cualquier especie, subespecie o raza de organismo de la clase taxonómica “ave”. En una realización preferida, “pájaros” se refiere a cualquier animal del orden taxonómico:

30 - “Anseriformes” (es decir, patos, gansos, cisnes y especies relacionadas). El orden Anseriformes contiene aproximadamente 150 especies de pájaros en tres familias: la Anhimidae (aves chillonas), Anseranatidae (el ganso urraco) y la Anatidae, que incluye más de 140 especies de aves acuáticas, entre ellas los patos, gansos y cisnes. Todas las especies en el orden están altamente adaptadas para una existencia acuática en la superficie del agua. Todas son de pies palmeados para una natación eficaz (a pesar de que algunos se han convertido 35 subsiguientemente en principalmente terrestres).

- “Galliformes” (es decir, pollos, codornices, pavos, faisanes y especies relacionadas). Galliformes es un orden de pájaros que contiene a los pollos, pavos, codornices y faisanes. En todo el mundo se encuentran aproximadamente 256 especies.

40 - “Columbiformes” (es decir, palomas y especies relacionadas). El orden de pájaros Columbiformes incluye las gaviotas y palomas muy difundidas.

En la presente invención, por la expresión “partícula retroviral endógena” o “partícula de retrovirus endógeno”, expresiones que pueden utilizarse de manera indistinta, pretende dar a entender una partícula retroviral o un retrovirus codificado y/o expresado a partir de secuencias provirales de ALV-E o EAV presentes en algunos 45 genomas de células aviares. En los pájaros se sabe que secuencias provirales de ALV-E están presentes en el genoma del pollo doméstico (excepto pollo de la línea-0), gallo rojo de la jungla y faisán de collar. En los pájaros, se sabe que secuencias provirales de EAV están presentes en todo el género Gallus que incluye pollos domésticos, pollos de la línea-0, gallo rojo de la jungla, gallo verde de la jungla, gallo gris de la jungla, gallo de la jungla de Ceilán y especies relacionadas) (véase Resnick et al., 1990, J. Virol., 64:4640-4653).

50 De acuerdo con una realización preferida, el pájaro de la invención se selecciona entre los pájaros que no comprenden secuencias provirales de ALV-E y EAV en su genoma. Un experto en la técnica es capaz de determinar si las secuencias de ALV-E y EAV están presentes en un genoma de pájaro (Johnson y Heneine, 2001; Weissmahr et al., 1996). El pájaro se selecciona del grupo que comprende Anseriformes (es decir, patos, gansos, cisnes). Por lo tanto, células derivadas de pájaros de este tipo no producen partículas de ALV-E y/o EAV endógenas competentes para la replicación. En una realización preferida, el pájaro de la presente invención se

selecciona entre el grupo que comprende patos, gansos, cisnes. De acuerdo con una realización más preferida, el pájaro es un pato, más preferiblemente patos de Pekín o de Muscovy. De acuerdo con una realización más preferida, el pájaro es un pato de Pekín. Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para obtener líneas celulares de pato diploides continuas, derivadas de células madre embrionarias (ES), en el que dichas líneas celulares de pato no producen partículas de retrovirus endógenos competentes para la replicación.

En esta memoria se describe un pájaro seleccionado entre los pájaros que no comprenden secuencias provirales de ALV-E completas en su genoma, pero finalmente secuencias provirales de EAV. Un experto en la técnica es capaz de determinar si secuencias de ALV-E y EAV parciales o completas están presentes en un genoma de pájaro (Johnson y Heneine, 2001). Se han seleccionado varias razas de pollo mediante crianza que no contienen secuencias provirales de ALV-E completas (es decir: cepa ev-0) y, por lo tanto, que no producen retropartículas de ALV-E infecciosas, tales como:

- pollo doméstico de línea 0 de la población de aves de corral East Lansing USDA (raza ELL-0). Los pollos de la línea 0 East Lansing no contienen loci (ev) virales endógenos relacionados con ALV (Dunwiddie y Faras, 1985).
- Líneas DE y PE11 del Institut National de la Recherche Agronomique (Domaine de Magneraud, Surgères, Francia).

Por lo tanto, células derivadas de pájaros ev-0 no producen partículas de ALV-E endógenas competentes para la replicación. En esta memoria se describe un pollo doméstico ev-0 (*Gallus gallus* subespecie domesticus), preferiblemente seleccionado entre ELL-0, DE y PE11.

Habitualmente, los pollos ev-0 contienen todavía secuencia proviral de EAV, pero hasta la fecha no se han identificado aislados de EAV infecciosos. Por lo tanto, en esta memoria se describe un procedimiento para obtener líneas celulares de pollo diploides continuas derivadas de células madre embrionarias (ES) de razas de pollo ev-0, en donde dichas líneas celulares de pollo ev-0 no producen partículas de retrovirus endógeno competente para la replicación.

En esta memoria se describe un pájaro seleccionado entre los pájaros que comprenden secuencias provirales de ALV-E y EAV completas y/o incompletas en su genoma, pero que son incapaces de producir retropartículas de ALV-E y EAV competentes para la replicación. Un experto en la técnica es capaz de determinar si se producen retropartículas infecciosas y/o no infecciosas de ALV-E y/o EAV a partir de células de pájaro (Johnson y Heneine, 2001; Weissmahr et al., 1996). Preferiblemente, el pájaro se selecciona del grupo que comprende pollo libre de patógenos específicos (SPF), preferiblemente de la raza Valo (Lohman) o Línea 22 (SPAFAS).

Por "competente para la replicación" se quiere dar a entender que las partículas retrovirales endógenas son infecciosas, es decir que partículas retrovirales de este tipo son capaces de infectar y de replicarse en células aviares de la invención.

El procedimiento de establecer líneas celulares aviares diploides continuas, denominadas EBx®, de la invención comprende dos etapas:

a) aislamiento, cultivo y expansión de células madre embrionarias procedentes de pájaros del orden de los Anseriformes que no contienen secuencias provirales endógenas completas, o un fragmento de las mismas, susceptibles para producir partículas retrovirales endógenas competentes para la replicación, más específicamente secuencias provirales de EAV y/o ALV-E o un fragmento de las mismas, en un medio de cultivo completo que contiene IGF-1 y CNTF y en presencia de una capa alimentadora y suplementado con suero animal; opcionalmente, dicho medio de cultivo completo puede comprender aditivos tales como aminoácidos adicionales (es decir, glutamina, aminoácidos no esenciales, ...), piruvato de sodio, beta-mercaptoetanol, vitaminas, hidrolizado de proteínas de origen no animal (es decir, yeastolate, hidrolizados vegetales (soja, trigo, ...));

b) pasaje modificando el medio de cultivo con el fin de obtener una separación total de dicho IGF-1 y CNTF, dicha capa alimentadora y dicho suero y, opcionalmente, dichos aditivos, y obtener adicionalmente líneas celulares aviares adherentes o en suspensión, denominadas EBx®, que no producen partículas de retrovirus endógenos competentes para la replicación, capaces de proliferar a lo largo de un prolongado período de tiempo, en un medio basal en ausencia de factores de crecimiento exógenos, capa alimentadora y suero animal.

La modificación del medio de cultivo de la etapa b) del procedimiento de establecer líneas celulares EBx®, con el fin de obtener una retirada progresiva o total de factores de crecimiento, suero y capa alimentadora, se puede hacer simultáneamente, sucesivamente o por separado. La secuencia de la retirada del medio de cultivo puede elegirse

entre:

- capa alimentadora/suero/factores de crecimiento;
- capa alimentadora/factores de crecimiento/suero;
- suero/factores de crecimiento/capa alimentadora;
- 5 - suero/ capa alimentadora/factores de crecimiento;
- factores de crecimiento/suero/capa alimentadora;
- factores de crecimiento/ capa alimentadora/suero.

Dichos factores de crecimiento son IGF-1 y CNTF.

10 En una realización preferida, la secuencia de la retirada es factores de crecimiento/ capa alimentadora/suero. En una realización preferida, la retirada de aditivos tales como piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales (NNEA – siglas en inglés), vitaminas, yeastolate, se realiza después de la retirada de la capa alimentadora y antes de la retirada del suero. Preferiblemente, la retirada de yeastolate se realiza después de la retirada de piruvato de sodio, NNEA y vitaminas.

15 De acuerdo con una realización preferida, las células madre embrionarias aviares de acuerdo con la etapa a) de la invención se recogen de embriones de aves en la oviposición, es decir, cuando se ha puesto el huevo. De acuerdo con Seller et al. (2006, J. Appl. Poult. Res., 15: 219-228), la oviposición corresponde a las siguientes fases de desarrollo de acuerdo con la clasificación de Eyal-Giladi (clasificación de EYAL-GILADI: EYAL-GILADI y KOCHAN, 1976, "From cleavage to primitive streak formation; a complementary normal table and a new look at the first stages of the development in the chick". "General Morphology" Dev. Biol. 49: 321-337):

- 20 - pato de Muscovy (también denominado pato Barbari): fase VII
- gallo de Guinea: fase VII-VIII
- pavo: fase VII-VIII
- pato de Pekín: fase VIII
- pollo: fase X
- 25 - codorniz japonesa: fase XI
- ganso: fase XI.

30 Preferiblemente, las células madre embrionarias (ES) de pato de la etapa a) se obtienen disociando embrión o embriones de pato de Pekín en torno a la fase VIII, (oviposición) de la clasificación de Eyal-Giladi. Si el huevo puesto se recoge en la oviposición, no está lo suficientemente desarrollado para recoger células madre embrionarias, el huevo puesto puede ser incubado adicionalmente entre varias horas (durante una noche) a uno hasta dos días para madurar al embrión. De acuerdo con una segunda realización, las células madre embrionarias (ES) de pato de la etapa a) proceden de un pato de Muscovy. En la oviposición, el pato de Muscovy no es lo suficientemente maduro, ya que se encuentra en torno a la fase VII, por lo tanto el huevo es incubado durante una noche para que madure hasta la fase VIII a X de la clasificación de Eyal-Giladi.

35 También se describe cuando las células madre embrionarias (ES) de pollo, preferiblemente de la raza de pollo ev-0 de la etapa a) se obtienen disociando embrión o embriones en torno a la fase X (oviposición) de la clasificación de Eyal-Giladi.

40 También se describe cuando las células madre embrionarias aviares de acuerdo con la etapa a) de la invención se recogen de embriones antes de la oviposición. Las limitaciones principales con las que se topa antes de la oviposición es el hecho de que el huevo ha de ser separado quirúrgicamente de las gallinas y que la cantidad de células ES por embrión es menos importante. Además de ello, en fases muy tempranas del desarrollo embrionario aviar, las células ES no están bien individualizadas, haciendo difícil el cultivo in vitro de células ES. Un experto en la técnica será capaz de definir el espacio de tiempo antes de la deposición del huevo que permita recoger células ES aviares.

45 También se describe cuando las células madre embrionarias madre de acuerdo con la etapa a) de la invención pueden recogerse del embrión aviar después de la oviposición hasta la eclosión. Sin embargo, células madre

embrionarias aviares entrarán progresivamente en una diferenciación para generar tejidos diferenciados; por lo tanto, se prefiere recoger ES aviares no demasiado tarde después de la puesta. Un experto en la técnica será capaz de definir el espacio de tiempo después de la puesta del huevo que permita recoger células madre embrionarias aviares.

5 De acuerdo con otra realización, las células de la etapa a) son una población de células madre embrionarias enriquecidas en células germinales primordiales (PGC – siglas en inglés). Más preferiblemente, las células ES aviares de la etapa a) son PGCs purificadas. En especies aviares, células germinales primordiales surgen de la región central del blastodermo (Ginsburg y Eyal-Giladi, 1987 Development 101(2): 209-19; Karagenc et al, 1996 Dev Genet 19(4):290-301; Petite et al, 1997 Poultry Sci. 76(8):1084-92). Después se desplazan a un sitio anterior, extra-
10 embrionario para alcanzar la cresta germinal. Colonizan la cresta germinal en que finalmente se diferencian en oocitos o espermatoцитos (Nieuwkoop y Sutasurya, 1979. The Migration of the primordial germ cells. En: Primordial germ cell in Chordates. London: Cambridge University Press págs. 113-127). En la bibliografía se han reseñado métodos para el aislamiento de PGCs a partir de embriones aviares donantes, y pueden ser fácilmente realizados por un experto en la técnica (véase, p. ej., el documento JP924997, publicado el 7 de septiembre de 1993, Pub. N° 05-227947; Chang et al. 1992. Cell Biol. Int. 19(2): 143-149; Nalto et al. 1994 Mol. Reprod. Dev. 39: 153-161; Yasuda et al. 1992, J. Reprod. Fert. 96: 521-528; Chang et al. 1992 Cell Biol. Int. Reporter 16(9): 853-857). De acuerdo con una realización, las PGCs se recogen de la sangre embrionaria recogida de la aorta dorsal de un embrión de pollo en la fase 12-14 de la clasificación de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton 1951 A series of normal stages in the development of chick embryo. J. Morphol. 88: 49-92). En otra realización preferida, se recogieron PGCs de la medialuna germinal por disección mecánica de embrión de pollo o a partir de las gónadas. Sin embargo, tal como se discute antes, se conocen y alternativamente se pueden utilizar otros métodos para aislar PGCs.

25 Estas células madres embrionarias aviares se caracterizan por un lento tiempo de duplicación que comprende entre 48 y 72 horas en cultivo a 39°C.

30 Sin estar ligados por una teoría, las condiciones del cultivo celular definidas de células ES aviares seguidas por la retirada progresiva de factores de crecimiento, capa alimentadora, aditivos y suero, permiten adaptar y seleccionar células que mantengan la mayoría de las características deseables de células ES (estabilidad del cariotipo, proliferación indefinida, expresión de marcadores de ES) pero, además, exhiben características favorables para la industria tales como el crecimiento en suspensión hasta elevadas densidades celulares en medio exento de suero. La telomerasa constituye uno de los marcadores de ES más importantes. Debido a la expresión sostenida y mantenida de telomerasa a lo largo de los pasajes de las células, células EBx® son continuas, (es decir, inmortales), pero además son genéticamente estables (es decir, diploides).

35 Más específicamente, la presente invención proporciona un procedimiento para obtener líneas celulares aviares diploides continuas derivadas de células ES, en el que dichas líneas celulares aviares no producen partículas retrovirales endógenas competentes para la replicación, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas de:

40 a) aislar embrión o embriones de pájaros, preferiblemente de pato, en una fase del desarrollo que comprende desde alrededor de la fase VI de la clasificación de Eyal-Giladi (clasificación de EYAL- GILADI: EYAL-GILADI y KOCHAN, 1976, "From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development in the chick". "General Morphology" Dev. Biol. 49:321-337) y antes de la eclosión, preferiblemente en torno a la oviposición, en donde el genoma de dichos pájaros no contiene secuencias provirales endógenas susceptibles de producir partículas retrovirales endógenas competentes para la replicación;

45 b) suspender células madre embrionarias (ES) aviares, obtenidas disociando embrión o embriones de la etapa a) en un medio de cultivo basal suplementado con:

- factor de crecimiento de insulina tipo 1 (IGF-1) y factor neurotrófico ciliar (CNTF);
- suero animal; y

c) sembrar la suspensión de células ES obtenida en la etapa b) sobre una capa de células alimentadoras, y cultivar adicionalmente las células ES durante al menos un pasaje;

50 e) retirar IGF-1 y CNTF del medio de cultivo, y cultivar adicionalmente las células ES aviares durante al menos un pasaje. Preferiblemente, la retirada de los factores de crecimiento seleccionados del grupo que comprende IGF-1 y CNTF del medio de cultivo se realiza simultáneamente, a lo largo de un pasaje. Habitualmente, la retirada de IGF-1 y CNTF se realiza en torno al pasaje N° 15 a N° 25. Alternativamente, la retirada de IGF-1 y CNTF se realiza disminuyendo progresivamente a lo largo de varios pasajes (al

menos 2 pasajes y aproximadamente hasta 15 pasajes);

f) disminuir progresivamente la concentración de células alimentadoras en el medio de cultivo con el fin de obtener una retirada total de la capa alimentadora después de varios pasajes y cultivar adicionalmente las células;

5 g) opcionalmente, disminuir progresivamente la concentración de aditivos en el medio de cultivo con el fin de obtener una retirada total de aditivos después de al menos un pasaje; y

h) opcionalmente, disminuir progresivamente la concentración de suero animal en el medio de cultivo con el fin de obtener una retirada total de suero animal después de varios pasajes; y

10 i) obtener líneas celulares aviares adherentes, denominadas EBx®, derivadas de células ES, capaces de proliferar en un medio basal en ausencia de factores de crecimiento, capa de alimentación opcionalmente sin suero animal y aditivos, y en donde dichas líneas celulares aviares diploides continuas no producen partículas de retrovirus endógenos competentes para la replicación;

15 j) opcionalmente, adaptar adicionalmente dichas líneas celulares EBx® aviares adherentes a las condiciones del cultivo en suspensión. La etapa de adaptación del cultivo celular a la suspensión puede tener lugar a lo largo del proceso de establecimiento de células EBx®. Por ejemplo, con células EBx® de pato derivadas de células madre embrionarias de Moscovy, las células se adaptaron al desarrollo en suspensión antes de la retirada de la capa alimentadora. Para células EBx® de pato (EB24, EB26, EB66) derivadas del pato de Pekín, las células se adaptaron al crecimiento en suspensión antes de la retirada del suero animal.

20 k) Opcionalmente, subclonar adicionalmente dichas células EBx® aviares, por ejemplo mediante dilución límite.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento para obtener líneas celulares aviares diploides continuas, denominadas EBx®, derivadas de células madres embrionarias (ES) aviares, en el que dichas líneas celulares aviares no producen partículas de retrovirus endógenos competentes para la replicación, y comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

25 a) aislar embrión o embriones de pájaros en una fase del desarrollo en torno a la oviposición, en donde el genoma de dichos pájaros no contiene secuencias provirales endógenas susceptibles de producir partículas retrovirales endógenas competentes para la replicación, y en donde dichos pájaros son del orden de los Anseriformes;

30 b) suspender células madres embrionarias (ES) aviares, obtenidas disociando embrión o embriones de la etapa a) en un medio de cultivo basal suplementado con al menos:

- factor de crecimiento de insulina tipo 1 (IGF-1) y factor neurotrófico ciliar (CNTF); y
- suero de mamífero tal como suero de bovino fetal;

35 c) sembrar la suspensión de células ES obtenida en la etapa b) sobre una capa de células alimentadoras, y cultivar adicionalmente las células ES durante al menos un pasaje;

e) retirar IGF-1 y CNTF del medio de cultivo, y cultivar adicionalmente las células ES aviares durante al menos un pasaje;

f) disminuir progresivamente la concentración de células alimentadoras en el medio de cultivo con el fin de obtener una retirada total de la capa alimentadora después de varios pasajes y cultivar adicionalmente las células;

40 g) disminuir progresivamente la concentración de dicho suero de mamífero en el medio de cultivo con el fin de obtener una retirada total de suero de mamífero después de varios pasajes; y

45 h) obtener líneas celulares EBx® aviares adherentes, derivadas de células ES, capaces de proliferar en un medio basal en ausencia de factores de crecimiento, capa alimentadora y suero de mamífero, y en donde dichas líneas celulares aviares diploides continuas no producen partículas de retrovirus endógenos competentes para la replicación;

i) opcionalmente, adaptar adicionalmente líneas celulares EBx® aviares adherentes a las condiciones del cultivo en suspensión, preferiblemente fomentando el crecimiento en forma de suspensión, más preferiblemente transfiriendo las líneas celulares EBx® aviares adherentes obtenidas en la etapa h) a otro soporte que tenga una característica de menor fijación que el soporte inicial (es decir, tal como un soporte de fijación Ultra Low).

La etapa j) de adaptar líneas celulares EBx® aviares adherentes a condiciones del cultivo en suspensión cuando se lleva a cabo, se puede efectuar en otra realización preferida antes de la etapa g) de disminuir progresivamente la concentración de suero de mamíferos en el medio de cultivo.

5 También se describe cuando el medio de cultivo basal en la etapa b) del procedimiento para obtener líneas celulares aviares diploides continuas de acuerdo con la presente invención es adicionalmente suplementado con un factor de crecimiento seleccionado del grupo que comprende interleucina 6 (IL-6), receptor de interleucina 6 (IL-6R), factor de células madre (SCF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), y dicho procedimiento comprende, además, una etapa d) de:

10 d) retirar opcionalmente del medio de cultivo todos los factores de crecimiento seleccionados del grupo que comprende IL-6, IL-6R, SCF, FGF y cultivar adicionalmente las células ES durante al menos un pasaje.

En una realización más preferida, cuando se lleva a cabo la etapa d), la etapa e) de retirar IGF-1 y CNTF del medio de cultivo se efectúa después de la etapa d) de retirar del medio de cultivo todos los factores de crecimiento seleccionados del grupo que comprende IL-6, IL-6R, SCF, FGF.

15 De acuerdo con la invención, "medio de cultivo basal" quiere dar a entender un medio de cultivo con una formulación clásica del medio que permite, por sí misma, al menos la supervivencia de las células e incluso un mejor crecimiento de las células. Ejemplos de medios basales son BME (medio de Eagle basal), MEM (medio de Eagle mínimo), medio 199, DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), GMEM (medio de Eagle modificado por Glasgow), DMEM-HamF12, Ham-F12 y Ham-F10, medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio de MacCoy 5A, RPMI 1640, GTM3. El medio basal comprende sales inorgánicas (por ejemplo: CaCl₂, KCl, NaCl, NaHCO₃, NaH₂PO₄, MgSO₄, ...), aminoácidos, vitaminas (tiamina, riboflavina, ácido fólico, pantotenato de D-Ca, ...) y otros componentes tales como glucosa, beta-mercapto-etanol, piruvato de sodio. Preferiblemente, el medio basal es un medio sintético. La Tabla 1 proporciona la composición de DMEM / HAMF12:

20

Tabla 1: Formulación de DMEM-HAM F12 (mg/l)

Sales inorgánicas		
	Cloruro de calcio anhidro	116,60
5	Nitrato férrico(III) • 9H ₂ O	0,05
	Sulfato férrico(II) • 7H ₂ O	0,417
	Cloruro de potasio	311,80
	Sulfato cúprico(II) • 5H ₂ O	0,0013
	Cloruro de magnesio • 6H ₂ O	61,20
10	Sulfato de magnesio anhidro	48,84
	Cloruro de sodio	6996,00
	Dihidrógeno-fosfato de sodio • H ₂ O	62,50
	Dihidrógeno-fosfato disódico anhidro	71,02
	Sulfato de zinc • 7H ₂ O	0,432
15	Hidrógeno-carbonato de sodio	1200,00
Aminoácidos		
	L-alanina	4,45
	L-arginina • HCl	147,50
20	L-asparagina • H ₂ O	7,50
	Ácido L-aspártico	6,65
	L-cistina • HCl • H ₂ O	31,29
	L-cisteína • 2HCl	17,56
	Ácido L-glutámico	7,35
25	L-glutamina en E15-813	365,00
	Glicina	18,75
	L-histidina • HCl • H ₂ O	31,48
	L-iso-leucina	54,47
	L-leucina	59,05
30	L-lisina • KCl	91,25
	L-metionina	17,24
	L-fenilalanina	35,48
	L-prolina	17,25
	L-serina	26,25
35	L-treonina	53,45

ES 2 442 009 T3

	L-triptófano	9,02
	L-tirosina	38,70
	L-valina	52,85
5	Vitaminas	
	D(+)-biotina	0,0035
	Pantotenato de D-calcio	2,24
	Cloruro de colina	8,98
	Ácido fólico	2,65
10	Mio-inositol	12,60
	Nicotinamida	2,02
	Piridoxal • HCl	2,00
	Piridoxina • HCl	0,031
	Riboflavina	0,219
15	Tiamina • KCl	2,17
	Timidina	0,365
	Vitamina B12	0,68
	Otros Componentes	
20	D-glucosa anhidra	3151,00
	Hipoxantina	2,10
	Ácido DL-68-lipoico	0,105
	Ácido linoleico	0,042
	Fenol Rojo	8,10
25	Putrescina • 2HCl	0,081
	Piruvato sódico	55,00

Además, el medio basal de la invención se puede complementar con aditivos seleccionados del siguiente grupo:

- L-glutamina 0,1 a 5 mM, preferiblemente L-glutamina entre 2 y 3 mM;

- piruvato de sodio 0,05 a 2 mM, preferiblemente piruvato de sodio entre 0,1 mM y 1 mM;

5 - 0,1 a 2,5% de aminoácidos no esenciales, preferiblemente alrededor de 1% de aminoácidos no esenciales;

- 0,1 a 2,5% de vitaminas, preferiblemente alrededor de 1% de vitaminas;

- beta-mercapto-etanol 0,05 a 5 mM, preferiblemente beta-mercapto-etanol alrededor de 0,16 mM;

- hidrolizado de proteínas de origen no animal.

10 Para el establecimiento de células EBx® de pato de la invención, el medio basal se complementa preferiblemente con hidrolizado de proteínas de origen no animal. Hidrolizados de proteínas de origen no animal se seleccionan del grupo que consiste en bacteria triptona, levadura triptona, hidrolizados vegetales tales como hidrolizados de soja, o una mezcla de los mismos. En una realización preferida, los hidrolizados de proteínas de origen no animal son hidrolizados de levadura. El término "hidrolizado" incluye cualquier digestión enzimática de peptona de soja o extracto de levadura. El hidrolizado se puede obtener a partir de una pluralidad de preparados de peptona de soja o extracto de levadura, respectivamente, que adicionalmente se pueden digerir enzimáticamente (por ejemplo, mediante papaína) y/o formar mediante autólisis, termólisis y/o plasmólisis. Los hidrolizados también se pueden obtener comercialmente, tal como Yeastolate, Hy-Soy, Hy-Yeast 412 y Hi-Yeast 444, de fuentes tales como SAFC BioSciences (anteriormente JRH) (Lenaxa, KA), Quest International (Norwich, N.Y.), OrganoTechnie S.A (Francia) o Deutsche Hefewerke GmbH (Alemania). Fuentes de extractos de levadura también se describen en el documento WO 98/15614. Fuentes de extractos de levadura e hidrolizados de soja también se describen en el documento WO 00/03000. Los hidrolizados utilizados en medios de la invención se purifican preferiblemente a partir de una fracción bruta, dado que impurezas que podrían interferir con un cultivo eficaz son eliminadas preferiblemente durante esta purificación, mejorando con ello la consistencia del hidrolizado. La purificación puede realizarse mediante ultrafiltración o cromatografía con Sephadex (por ejemplo con Sephadex G25 o Sephadex G10, o materiales equivalentes), cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaños o cromatografía de "fase inversa". Preferiblemente, la purificación se realiza mediante ultrafiltración utilizando un filtro de corte de 10 kDa. Estos procedimientos son bien conocidos en el sector. Utilizando estos métodos se pueden seleccionar fracciones que contengan hidrolizados de soja o de levadura de un peso molecular definido. Preferiblemente, los pesos moleculares medios de los hidrolizados de soja y de levadura oscilan preferiblemente entre aproximadamente 220 y 375 daltons. Preferiblemente, el hidrolizado de levadura está presente en el medio de cultivo celular. Hidrolizado de levadura 50X (alrededor de 200 g/l) obtenido, por ejemplo, de SAFC-BIOSCIENCES (Ref 58902C) está presente en el medio de cultivo celular a una concentración final que comprende entre alrededor de 0,1X y 2X, preferiblemente alrededor de 0,5X hasta alrededor de 1X en el medio de cultivo. El hidrolizado de soja también se puede añadir al medio de cultivo celular. Hidrolizado de soja 50X obtenido, por ejemplo, de SAFC-BIOSCIENCES (Ref 58903C) se añade a una concentración final que comprende entre alrededor de 0,1X y 2X, preferiblemente alrededor de 1X en el medio de cultivo. Alternativamente, se puede añadir una mezcla de hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura al medio de cultivo celular según se describe en el documento US2004/0077086.

40 De acuerdo con un medio basal preferido de la invención es DMEM-HamF12 que está complementado con L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, 1% de aminoácidos no esenciales, vitaminas 1%, beta-mercapto-etanol 0,16 mM y, opcionalmente, con hidrolizado de levadura 1X.

Por "medio de cultivo completo" se quiere dar a entender un medio de cultivo basal complementado o no, preferiblemente un medio sintético basal suplementado con al menos un factor de crecimiento y suero animal. Un ejemplo de medio de cultivo completo se describe en los documentos WO 03/076601, WO 05/007840, EP 787 180, US 6.114.168, US 5.340.740, US 6.665.479, US 5.830.510 y en Pain et al. (1996, Development 122:2339-2348). Alternativamente, el medio de cultivo completo puede ser un medio acondicionado, preferiblemente medio acondicionado BRL. A modo de ejemplo, medio acondicionado BRL se prepara de acuerdo con técnicas reconocidas en la técnica tal como se describe por Smith y Hooper (1987, Dev. Biol. 121:1-9), Células BRL están disponibles de ATCC, número de acceso CRL-1442. El medio acondicionado se puede suplementar con factores de crecimiento exógenos y suero animal tal como se describe más adelante.

La expresión "factores de crecimiento", tal como se utiliza en esta memoria, significa factor de crecimiento necesario para la supervivencia y el desarrollo de las células ES aviares no diferenciadas en cultivo en un medio de

cultivo basal. Es posible distinguir esquemáticamente dos familias de factores de crecimiento: las citocinas y los factores tróficos. Las citocinas son principalmente citocinas cuya acción es a través de un receptor que está asociado con la proteína gp130. Así, factor inhibidor de leucemia (LIF), interleucina 11, interleucina 6, receptor de interleucina 6, factor neurotrófico ciliar (CNTF), oncostatina y cardiotrofina tienen un modo de acción similar con el reclutamiento al nivel del receptor de una cadena específica y la combinación de esta última con la proteína gp130 en forma monomérica o, a veces, hetero-dimérica. Los factores tróficos son principalmente factor de células madre (SCF), factor de crecimiento de insulina tipo 1 (IGF-1) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), preferiblemente FGF básico (bFGF) o FGF humano (hFGF).

El medio de cultivo completo de acuerdo con la invención comprende medio de cultivo basal, preferiblemente medio sintético basal, y al menos una citocina, cuya acción es a través de un receptor que está asociado con la proteína gp130 y/o al menos un factor trófico. Preferiblemente, el medio de cultivo completo de acuerdo con la invención comprende medio basal y al menos un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en factor inhibidor de leucemia (LIF), oncostatina, cardiotrofina, factor de crecimiento de insulina tipo 1 (IGF-1), factor neurotrófico ciliar (CNTF), interleucina 6 (IL-6), receptor de interleucina 6 (IL-6R), factor de células madre (SCF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), interleucina 11 (IL-11). De acuerdo con una primera realización preferida, el medio de cultivo completo es medio basal suplementado con suero animal y con al menos IGF-1 y CNTF. De acuerdo con una segunda realización preferida, el medio de cultivo completo es medio basal suplementado con suero animal y al menos IGF-1, CNTF, IL-6 e IL-6R. De acuerdo con una tercera realización preferida, el medio de cultivo completo es medio basal suplementado con suero animal y al menos IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF, FGF. De acuerdo con otra realización, el medio de cultivo completo es un medio de cultivo acondicionado que comprende factores de crecimiento (es decir, expresados por células BRL o STO, por ejemplo) y opcionalmente suplementado con al menos un factor de crecimiento exógeno seleccionado del grupo que comprende: LIF, IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF, FGF, IL-11. La concentración de factores de crecimiento IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF, FGF, IL-11 en el medio basal o en el medio de cultivo acondicionado está comprendida entre aproximadamente 0,01 y 10 ng/ml, preferiblemente entre 0,1 y 5 ng/ml y, más preferiblemente, alrededor de 1 ng/ml.

El medio de cultivo de la invención puede comprender también, además, antibióticos tales como, por ejemplo, gentamicina, penicilina y estreptomina para prevenir una contaminación bacteriana. Los antibióticos se pueden añadir al medio de cultivo en los pasajes tempranos del cultivo celular ES. Por ejemplo, se pueden añadir al medio de cultivo gentamicina a una concentración final de 10 ng/ml, penicilina a una concentración final de 100 U/ml y estreptomina a una concentración final de 100 µg/ml. En una realización preferida, no se añaden antibióticos al medio de cultivo durante las etapas tardías del procedimiento de establecimiento de líneas celulares aviares diploides continuas de la invención.

Durante el procedimiento de establecimiento de líneas madres embrionarias aviares de la invención, las células se cultivan en una capa de células alimentadoras. Más preferiblemente, las células alimentadoras son células animales o líneas celulares cultivadas con el fin de cultivar células ES aviares. Alternativamente, las células alimentadoras pueden ser sustituidas con matriz extracelular más factores de crecimiento ligados. A la matriz alimentadora se la aludirá en lo que sigue como células alimentadoras o matriz extracelular. Una matriz alimentadora, tal como se utiliza en esta memoria, se construye de acuerdo con procesos conocidos en la técnica. Tal como se señala arriba se prefiere que la matriz alimentadora esté pre-acondicionada. Por el término "pre-acondicionada" se quiere dar a entender que la matriz alimentadora es cultivada en presencia de medios durante un período de tiempo antes de depositar células que proceden de huevos de aves fertilizados en el disco blastodérmico en contacto con la matriz alimentadora, p. ej. durante un tiempo suficiente para iniciar y establecer la producción, por ejemplo, de factores de crecimiento u otros factores por parte de la matriz alimentadora; habitualmente, una matriz alimentadora se pre-acondiciona cultivando la matriz alimentadora por sí misma durante uno a dos días antes de depositar células que proceden de los huevos de aves fertilizados en el disco blastodérmico en contacto con la matriz alimentadora. Las células alimentadoras comprenden preferiblemente células de fibroblastos de ratón. Se prefieren fibroblastos de STO, pero también son adecuados fibroblastos primarios. También, aun cuando la presente invención ha sido descrita con respecto al uso de matrices alimentadoras de células de ratón, se contempla que también se puedan utilizar matrices alimentadoras que comprenden células procedentes de otras especies murinas (p. ej. rata); otras especies de mamíferos (p. ej. especies de ungulados, bovinas, porcinas); o especies aviares (p. ej. gallináceas, pollo, pavo, pato, ganso, codorniz, faisán). En otra realización, células alimentadoras de la invención se pueden transfectar con vector o vectores de expresión que permiten, por ejemplo, la expresión constitutiva de factores de crecimiento tales como SCF aviar en células STO. Así, este "alimentador" produce el factor en una forma que es soluble y/o está fijada en la membrana del plasma de las células. Así, el proceso de cultivo de la presente invención puede comprender opcionalmente, establecer una monocapa de células alimentadoras. Las células alimentadoras son mitóticamente inactivadas utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, las células alimentadoras pueden ser expuestas a radiación X o gamma (p. ej. 4000 Rads de radiación gamma) o pueden ser tratadas con mitomicina C (p. ej. 10 µg/ml durante 2-3 horas). Procesos para inactivar mitóticamente células también se detallan en la información típicamente enviada con células de American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University

Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209 (p. ej. células alimentadoras STO están disponibles bajo el número de acceso 1503 de ATCC). Mono-capas pueden cultivarse opcionalmente hasta una confluencia de aproximadamente el 80%, preferiblemente hasta una confluencia de aproximadamente el 90% y más preferiblemente hasta una confluencia de aproximadamente 100%. Aun cuando la configuración de las células alimentadoras como una mono-
 5 capa es la configuración preferida para el cultivo, se contempla que cualquier configuración adecuada esté dentro del alcance de la presente invención. Así, por ejemplo, se contempla que capas, mono-capas, racimos, agregados u otras asociaciones o agrupaciones de células alimentadoras caigan dentro del alcance de la presente invención y se contempla particularmente que caigan dentro del significado del término "matriz".

El medio de cultivo de esta invención está suplementado con suero animal. El suero animal preferiblemente
 10 utilizado es suero de un animal fetal. Se prefiere suero de bovino fetal. También, aun cuando la presente invención ha sido descrita con respecto al uso de suero de bovino fetal, se contempla que también se puede utilizar suero animal que comprende suero procedente de otras especies animales (p. ej. pollo, caballo, porcino, ungulados, etc.). La concentración final de suero animal en el medio de cultivo comprende entre aproximadamente 1 y 25%, preferiblemente entre 5% y 20%, más preferiblemente entre 8% y 12%. En una realización preferida, la
 15 concentración final de suero animal en el medio de cultivo es aproximadamente 10%. De acuerdo con una realización preferida, el medio de cultivo comprende aproximadamente 10% de suero de ternero fetal.

Se describe cuando el pájaro de la presente invención se selecciona del orden de los Anseriformes y es, preferiblemente, un pato, más preferiblemente un pato de Pekín y, más preferiblemente, la raza M14 o GL30 del
 20 pato de Pekín. De acuerdo con una segunda realización preferida, el pájaro de la presente invención es un pato de Muscovy. Por lo tanto, la presente invención proporciona un primer procedimiento para obtener líneas celulares de pato diploides continuas derivadas de células madres embrionarias (ES), en donde dichas líneas celulares de pato no producen partículas de retrovirus endógeno competente para la replicación, y dicho procedimiento comprende las etapas de:

a) aislar embrión o embriones de pato en la oviposición (es decir, puesta de huevos), o ligeramente
 25 antes o después de la oviposición. Opcionalmente, el huevo se puede incubar, habitualmente durante una noche, para que madure (es decir, pato de Muscovy);

b) suspender células madres embrionarias (ES) de pato, obtenidas disociando embrión o embriones de la
 30 etapa a) en un medio de cultivo basal suplementado con factor de crecimiento de insulina tipo 1 (IGF-1), factor neurotrófico ciliar (CNTF), interleucina 6 (IL-6), receptor de interleucina 6 (IL-6R), factor de células madre (SCF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y suero animal;

c) sembrar la suspensión de células ES obtenida en la etapa b) sobre una capa de células alimentadoras y cultivar adicionalmente las células ES de pato durante al menos 1 pasaje;

d) retirar todos los factores de crecimiento seleccionados del grupo que consiste en IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R,
 35 SCF, FGF del medio de cultivo a lo largo de un intervalo de 1 a alrededor de 15 pasajes, preferiblemente de manera simultánea a lo largo de un pasaje, y cultivar adicionalmente las células ES de pato durante al menos un pasaje;

f) disminuir progresivamente la concentración de células alimentadoras en el medio de cultivo, de un pasaje a
 otro, con el fin de obtener una retirada total de la capa alimentadora después de varios pasajes, preferiblemente después de alrededor de 5 a alrededor de 25 pasajes, y cultivar adicionalmente las células;

g) opcionalmente, disminuir progresivamente la concentración de suero animal en el medio de cultivo con
 el fin de obtener una retirada total de suero animal después de varios pasajes; y

h) obtener líneas de células de pato adherentes derivadas de células ES, denominadas EBx® de pato,
 45 capaces de proliferar en un medio basal en ausencia de factores de crecimiento, capa alimentadora opcionalmente sin suero animal, y en donde dichas líneas de células de pato diploides continuas no producen partículas de retrovirus endógeno competente para la replicación;

i) opcionalmente, adaptar adicionalmente líneas de células de pato adherentes a las condiciones de
 cultivo en suspensión. Durante el proceso se retiran aditivos del medio basal y preferiblemente entre las etapas f) y g) o entre las etapas g) y h).

La concentración de suero animal en la etapa b) es preferiblemente de 5 a 10%. La concentración de factor de
 50 crecimiento de insulina tipo 1 (IGF-1), factor neurotrófico ciliar (CNTF), interleucina 6 (IL-6), receptor de interleucina 6 (IL-6R), factor de células madre (SCF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) es preferiblemente de aproximadamente 1 ng/ml.

Se describe un segundo procedimiento para obtener líneas celulares de pato diploides continuas derivadas de

células madres embrionarias (ES), en donde dichas líneas celulares de pato no producen partículas de retrovirus endógeno competente para la replicación, y dicho procedimiento comprende las etapas de:

- 5 a) aislar embrión o embriones de pato en la oviposición (es decir, puesta de huevos), o ligeramente antes o después de la oviposición. Opcionalmente, el huevo se puede incubar, habitualmente durante una noche, para que madure (es decir, pato de Muscovy);
- b) suspender células madres embrionarias (ES) de pato, obtenidas disociando embrión o embriones de la etapa a) en un medio de cultivo basal suplementado con IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF y FGF y suero animal;
- 10 c) sembrar la suspensión de células ES obtenida en la etapa b) sobre una capa de células alimentadoras y cultivar adicionalmente las células ES de pato durante al menos 1 pasaje;
- d) retirar todos los factores de crecimiento seleccionados del grupo que comprende IL-6, IL-6R, SCF, FGF del medio de cultivo a lo largo de un intervalo de 1 a alrededor de 15 pasajes, preferiblemente de manera simultánea a lo largo de un pasaje, y cultivar adicionalmente las células ES de pato durante al menos un pasaje;
- 15 e) retirar los factores de crecimiento IGF-1 y CNTF del medio de cultivo a lo largo de un intervalo de 1 a alrededor de 15 pasajes, preferiblemente de manera simultánea a lo largo de un pasaje, y cultivar adicionalmente las células ES de pato durante al menos un pasaje;
- f) disminuir progresivamente la concentración de células alimentadoras en el medio de cultivo, con el fin de obtener una retirada total de la capa alimentadora después de varios pasajes, preferiblemente después de alrededor de 5 a alrededor de 25 pasajes, y cultivar adicionalmente las células;
- 20 g) opcionalmente, disminuir progresivamente la concentración de suero animal en el medio de cultivo con el fin de obtener una retirada total de suero animal después de varios pasajes;
- h) obtener líneas de células de pato adherentes derivadas de células ES, denominadas EBx® de pato, capaces de proliferar en un medio basal en ausencia de factores de crecimiento, capa alimentadora opcionalmente sin suero animal, y en donde dichas líneas de células de pato diploides continuas no producen partículas de retrovirus endógeno competente para la replicación;
- 25 i) opcionalmente, adaptar adicionalmente líneas de células de pato adherentes a las condiciones de cultivo en suspensión. Durante el proceso se retiran aditivos del medio basal y preferiblemente entre las etapas f) y g) o entre las etapas g) y h).

30 La concentración de suero animal en la etapa b) es preferiblemente de 5 a 10%. La concentración de IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF y FGF es preferiblemente de aproximadamente 1 ng/ml.

La presente invención también proporciona un procedimiento para obtener líneas celulares de pato diploides continuas derivadas de células madres embrionarias (ES), en donde dichas líneas celulares de pato no producen partículas de retrovirus endógeno competente para la replicación, y dicho procedimiento comprende las etapas de:

- 35 a) aislar embrión o embriones de pato en la oviposición (es decir, puesta de huevos), o ligeramente antes o después de la oviposición. Opcionalmente, el huevo se puede incubar, habitualmente durante una noche, para que madure (es decir, pato de Muscovy);
- b) suspender células madres embrionarias (ES) de pato, obtenidas disociando embrión o embriones de la etapa a) en un medio de cultivo basal suplementado con factor de crecimiento de insulina tipo 1 (IGF-1) y factor neurotrófico ciliar (CNTF) y suero animal;
- 40 c) sembrar la suspensión de células ES obtenida en la etapa b) sobre una capa de células alimentadoras y cultivar adicionalmente las células ES de pato durante al menos 1 pasaje;
- d) retirar los factores de crecimiento IGF-1 y CNTF del medio de cultivo a lo largo de un intervalo de 1 a alrededor de 15 pasajes, preferiblemente de manera simultánea a lo largo de un pasaje, y cultivar adicionalmente las células ES de pato durante al menos un pasaje;
- 45 f) disminuir progresivamente la concentración de células alimentadoras en el medio de cultivo, con el fin de obtener una retirada total de la capa alimentadora después de varios pasajes, preferiblemente después de alrededor de 5 a alrededor de 25 pasajes, y cultivar adicionalmente las células; ¿Separación de aditivos?
- g) opcionalmente, disminuir progresivamente la concentración de suero animal en el medio de cultivo con el fin de obtener una retirada total de suero animal después de varios pasajes; y

h) obtener líneas de células de pato adherentes derivadas de células ES, denominadas EBx® de pato, capaces de proliferar en un medio basal en ausencia de factores de crecimiento, capa alimentadora opcionalmente sin suero animal, y en donde dichas líneas de células aviares diploides continuas no producen partículas de retrovirus endógeno competente para la replicación;

5 i) opcionalmente, adaptar adicionalmente líneas de células EBx® de pato adherentes a las condiciones de cultivo en suspensión.

Durante el proceso se retiran aditivos del medio basal y preferiblemente entre las etapas f) y g) o entre las etapas g) y h).

10 La concentración de suero animal en la etapa b) es preferiblemente de 5 a 10%. La concentración de IGF-1 y CNTF es preferiblemente de aproximadamente 1 ng/ml.

Una vez que se han obtenido líneas de células de pato adherentes o en suspensión, el procedimiento de la invención puede comprender también la etapa adicional de adaptar células EBx® de pato al crecimiento en medio de cultivo celular sin hidrolizado de proteínas de origen no animal tal como hidrolizados de levadura.

15 Preferiblemente, líneas de células EBx® de pato de la invención no exhiben actividad de transcriptasa inversa mediante el análisis Q-PERT. Además de ello, por parte de células EBx® de pato no se producen partículas de retrovirus endógeno competente para la replicación, según se demuestra por experimentos de co-cultivo de células EBx® de pato de la invención con células competentes para la replicación de ALV tal como células QT6 de codorniz o células DF1 de pollo. Además, el análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM – siglas en inglés) demuestra también la ausencia de partículas de retrovirus endógeno competente para la replicación en células
20 EBx® de pato. Preferiblemente, la línea de células EBx® de pato de la invención se selecciona entre EB24 de pato, EB26 de pato y EB66 de pato según se describe más adelante en esta memoria.

También se describe cuando el pájaro de la presente invención se selecciona del orden de las Galliformes y, más preferiblemente, es un pollo, preferiblemente un pollo doméstico ev-0 (*Gallus gallus* subespecie *domesticus*). Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para obtener líneas de células de pollo doméstico ev-0
25 diploides continuas derivadas de células madres embrionarias (ES), en donde dichas líneas de células de pollo doméstico ev-0 no producen partículas de retrovirus ALV-E endógeno competentes para la replicación, y dicho procedimiento comprende las etapas de:

a) aislar embrión o embriones de pollo doméstico ev-0 en la oviposición (es decir, puesta de huevos), o ligeramente antes o después de la oviposición;

30 b) suspender células madres embrionarias (ES) de pollo doméstico ev-0, obtenidas disociando embrión o embriones de la etapa a) en un medio de cultivo basal suplementado con IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF y FGF y suero animal;

c) sembrar la suspensión de células ES obtenida en la etapa b) sobre una capa de células alimentadoras y cultivar adicionalmente las células ES de pollo doméstico ev-0 durante al menos 1 pasaje;

35 d) retirar todos los factores de crecimiento seleccionados del grupo que comprende IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF, FGF del medio de cultivo a lo largo de un intervalo de 1 a alrededor de 15 pasajes, preferiblemente de manera simultánea a lo largo de un pasaje, y cultivar adicionalmente las células ES de pollo durante al menos un pasaje;

40 f) disminuir progresivamente la concentración de células alimentadoras en el medio de cultivo, con el fin de obtener una retirada total de la capa alimentadora después de varios pasajes, preferiblemente después de alrededor de 5 a alrededor de 25 pasajes, y cultivar adicionalmente las células;

g) opcionalmente, disminuir progresivamente la concentración de suero animal en el medio de cultivo con el fin de obtener una retirada total de suero animal después de varios pasajes; y

45 h) obtener líneas de células de pollo doméstico ev-0 adherentes derivadas de células ES, denominadas EBx ev-0, capaces de proliferar en un medio basal en ausencia de factores de crecimiento, capa alimentadora opcionalmente sin suero animal, y en donde dichas líneas de células aviares diploides continuas no producen partículas de retrovirus ALV-E endógeno competente para la replicación;

i) opcionalmente, adaptar adicionalmente líneas de células EBx ev-0 adherentes a las condiciones de cultivo en suspensión.

50 Durante el proceso se retiran aditivos del medio basal y preferiblemente entre las etapas f) y g) o entre las

etapas g) y h).

La concentración de suero animal en la etapa b) es preferiblemente de 5 a 10%. La concentración de IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF y FGF es preferiblemente de aproximadamente 1 ng/ml.

5 Se describe un segundo procedimiento para obtener líneas celulares de pollo doméstico ev-0 diploides continuas derivadas de células madres embrionarias (ES), en donde dichas líneas celulares de pollo no producen partículas de retrovirus ALV-E endógeno competente para la replicación, y dicho procedimiento comprende las etapas de:

a) aislar embrión o embriones de pollo doméstico ev-0 en la oviposición (es decir, puesta de huevos), o ligeramente antes o después de la oviposición;

10 b) suspender células madres embrionarias (ES) de pollo doméstico ev-0, obtenidas disociando embrión o embriones de la etapa a) en un medio de cultivo basal suplementado con IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF y FGF y suero animal;

c) sembrar la suspensión de células ES obtenida en la etapa b) sobre una capa de células alimentadoras y cultivar adicionalmente las células ES de pollo doméstico ev-0 durante al menos 1 pasaje;

15 d) retirar todos los factores de crecimiento seleccionados del grupo que comprende IL-6, IL-6R, SCF, FGF del medio de cultivo a lo largo de un intervalo de 1 a alrededor de 15 pasajes, preferiblemente de manera simultánea a lo largo de un pasaje, y cultivar adicionalmente las células ES de pato durante al menos un pasaje;

20 e) retirar los factores de crecimiento IGF-1 y CNTF del medio de cultivo a lo largo de un intervalo de 1 a alrededor de 15 pasajes, preferiblemente de manera simultánea a lo largo de un pasaje, y cultivar adicionalmente las células ES de pollo doméstico ev-0 durante al menos un pasaje;

f) disminuir progresivamente la concentración de células alimentadoras en el medio de cultivo, con el fin de obtener una retirada total de la capa alimentadora después de varios pasajes, preferiblemente después de alrededor de 5 a alrededor de 45 pasajes, y cultivar adicionalmente las células;

25 g) opcionalmente, disminuir progresivamente la concentración de suero animal en el medio de cultivo con el fin de obtener una retirada total de suero animal después de varios pasajes;

30 h) obtener líneas de células de pollo doméstico ev-0 adherentes derivadas de células ES, capaces de proliferar en un medio basal en ausencia de factores de crecimiento, capa alimentadora opcionalmente sin suero animal, y en donde dichas líneas de células de pollo doméstico ev-0 diploides continuas, denominadas EBx® de pollo, no producen partículas de retrovirus endógeno competente para la replicación;

i) opcionalmente, adaptar adicionalmente líneas de células de pollo doméstico ev-0 adherentes a las condiciones de cultivo en suspensión.

Durante el proceso se retiran aditivos del medio basal y preferiblemente entre las etapas f) y g) o entre las etapas g) y h).

35 La concentración de suero animal en la etapa b) es preferiblemente de 5 a 10%. La concentración de IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF y FGF es preferiblemente de aproximadamente 1 ng/ml.

40 Se describe un tercer procedimiento para obtener líneas celulares de pollo doméstico ev-0 diploides continuas derivadas de células madres embrionarias (ES), en donde dichas líneas celulares de pollo doméstico ev-0 no producen partículas de retrovirus endógeno competente para la replicación, y dicho procedimiento comprende las etapas de:

a) aislar embrión o embriones de pollo doméstico ev-0 en la oviposición (es decir, puesta de huevos), o ligeramente antes o después de la oviposición;

b) suspender células madres embrionarias (ES) de pollo doméstico ev-0, obtenidas disociando embrión o embriones de la etapa a) en un medio de cultivo basal suplementado con IGF-1 y CNTF y suero animal;

45 c) sembrar la suspensión de células ES obtenida en la etapa b) sobre una capa de células alimentadoras y cultivar adicionalmente las células ES de pollo doméstico ev-0 durante al menos 1 pasaje;

d) retirar los factores de crecimiento IGF-1 y CNTF del medio de cultivo a lo largo de un intervalo de 1 a alrededor de 15 pasajes, preferiblemente de manera simultánea a lo largo de un pasaje, y cultivar

adicionalmente las células ES de pollo doméstico ev-0 durante al menos un pasaje;

f) disminuir progresivamente la concentración de células alimentadoras en el medio de cultivo, con el fin de obtener una retirada total de la capa alimentadora después de varios pasajes, preferiblemente después de alrededor de 5 a alrededor de 45 pasajes, y cultivar adicionalmente las células;

5 g) opcionalmente, disminuir progresivamente la concentración de suero animal en el medio de cultivo con el fin de obtener una retirada total de suero animal después de varios pasajes; y

10 h) obtener líneas de células de pollo doméstico ev-0 adherentes derivadas de células ES, denominadas EBx® ev-0 de pollo, capaces de proliferar en un medio basal en ausencia de factores de crecimiento, capa alimentadora opcionalmente sin suero animal, y en donde dichas líneas de células aviares diploides continuas no producen partículas de retrovirus endógeno competente para la replicación;

i) opcionalmente, adaptar adicionalmente líneas de células de pollo doméstico ev-0 adherentes a las condiciones de cultivo en suspensión.

Durante el proceso se retiran aditivos del medio basal y preferiblemente entre las etapas f) y g) o entre las etapas g) y h).

15 La concentración de suero animal en la etapa b) es preferiblemente de 5 a 10%. La concentración de IGF-1 y CNTF es preferiblemente de aproximadamente 1 ng/ml.

20 Se describe cuando el pájaro de la presente invención es un pollo doméstico (*Gallus gallus* subespecie domesticus) obtenido de una bandada libre de patógenos específicos (SPF). Más preferiblemente, la raza de pollos es White-Leghorn. Huevos de pollos SPF han sido rastreados en cuanto a la ausencia de patógenos bacterianos y virus de pollo conocidos, incluidos el virus de la reticuloendoteliosis (REV) y el virus de leucosis exógena aviar (ALA-A, ALV-B, ALV-C, ALV-D, ALV-J). El huevo SPF de la invención pueden ser huevos VALO de LOHMANN (Cuxhaven, Alemania) o huevos L22 de CHARLES RIVER (Spafas). Por lo tanto, la presente invención proporciona también procedimientos para obtener líneas de células de pollo diploides continuas derivadas de células madre embrionarias (ES) obtenidas de huevos de pollo SPF tal como las descritas con los huevos de pollo ev-0.

25 Preferiblemente, la línea de células EBx® de pollo obtenida de huevos SPF es EBv13.

30 Líneas de células EBx® de pollo pueden exhibir actividad de transcriptasa inversa mediante análisis Q-PERT, pero sin producir partículas de retrovirus endógeno competente para la replicación. La ausencia de partículas de retrovirus endógeno competente para la replicación se puede demostrar mediante experimentos de co-cultivo de células ev-0 de EBx® de pollo de la invención con células competentes para la replicación de ALV, tales como células QT6 de codorniz o células DF1 de pollo. Además, la ausencia de partículas de retrovirus endógenos en células EBx® ev-0 de pollo puede también demostrarse mediante TEM.

35 La temperatura corporal del pájaro es habitualmente alrededor de 39°C. Por lo tanto, los procedimientos de la invención pueden comprender también la etapa adicional de disminuir la temperatura del cultivo celular hasta 37°C, con el fin de adaptar las líneas celulares aviares de la invención a crecer a 37°C. Preferiblemente, la adaptación a la temperatura se realiza después del agotamiento del alimentador y antes del agotamiento del suero. Alternativamente, la adaptación a la temperatura se realiza después de la etapa de agotamiento del suero o después de la etapa de adaptar las líneas celulares al cultivo en suspensión.

40 Las líneas EBx® establecidas, obtenidas mediante el procedimiento de la invención, tienen la característica de desarrollarse como células adherentes o como células en suspensión en un medio de cultivo exento de factores de crecimiento exógenos y suero animal y sin células alimentadoras. Se pueden utilizar diferentes técnicas solas o en combinación para adaptar células al cultivo en suspensión, entre ellas:

- se siembran células adherentes a una elevada densidad celular, ligeramente por encima de la confluencia de las células, para obligar a las células a entrar en suspensión;

45 - se siembran células adherentes en un medio de cultivo celular con una baja concentración del suero animal;

- se siembran células adherentes en recipientes de cultivo celular hechos de plástico que no permiten la adherencia de células o permiten una débil adherencia de células tales como platos y placas bacterianos y placas de fijación ultra-baja desarrolladas por compañías tales como Corning (platos y placas de cultivo de tejidos Ref. 3262, 3473, 3471, 3474; matraces Ref. 3814...) o Sarstedt (matraz Ref. 831810502...);

50 - se siembran células adherentes en el recipiente y se cultivan bajo agitación (aprox. 50 rpm).

Las células EBx®, preferiblemente EBx® de pato y EBx® ev-0 de pollo se pueden cultivar in vitro a lo largo de un período de tiempo considerable. Ventajosamente, las EBx® adherentes o independientes de anclaje (es decir, “en suspensión”) obtenidas mediante el procedimiento de la invención son capaces de proliferar durante al menos 50 generaciones, al menos 75 generaciones, al menos 100 generaciones, al menos 125 generaciones, al menos 150
 5 generaciones, al menos 175 generaciones, al menos 200 generaciones, al menos 250 generaciones. La expresión “línea” se entiende que significa cualquier población de células capaz de proliferar indefinidamente en cultivo in vitro al tiempo que conserva en menor o mayor grado las mismas características morfológicas y fenotípicas. Se pueden obtener clones, por ejemplo mediante dilución límite a partir de células EBx® de la invención. Estos clones son células que son genéticamente idénticas a la célula de la que se deriva por división.

10 La presente solicitud describe las líneas celulares aviares diploides continuas, denominadas EBx®, obtenibles mediante el procedimiento de la invención, siendo dichas EBx® pequeñas, redondas (es decir, diámetro alrededor de 10 µm) individualizadas, con un tiempo de duplicación de alrededor de 30 horas o menos a 37°C o 39°C. Las células EBx® aviares, preferiblemente EBx® de pato o EBx® ev-0 de pollo, expresan un fenotipo de célula madre embrionaria con las siguientes características:

- 15
- una elevada relación núcleo-citoplásmica,
 - una actividad de telomerasa endógena,
 - opcionalmente, pueden expresar uno o más marcadores ES adicionales tales como fosfatasa alcalina, marcadores SSEA-1, EMA-1, ENS1.
 - Un tiempo de duplicación menor que el tiempo de duplicación de las células ES aviares de la etapa a)
- 20 del procedimiento de la invención (48 h a 72 h a 39°C) de aproximadamente 30 horas o menos (preferiblemente 24 horas) a 37°C.

Dichas células no producen partículas de retrovirus endógenos competentes para la replicación.

25 Las líneas celulares EBx® aviares son capaces de proliferar indefinidamente en un medio basal, en particular en un medio tal como medio SAFC Excell, DMEM, GMEM, DMEM-HamF12 o McCoy, exento de factores de crecimiento exógenos, suero y/o capa alimentadora inactivada, opcionalmente complementado con diversos aditivos comúnmente utilizados por personas expertas en la técnica. Ejemplos de aditivos son aminoácidos no esenciales, vitaminas, piruvato de sodio y antibióticos. Células EBx® de pato de la invención tienen la notoria característica de desarrollarse en un medio de cultivo basal que no está complementado con glutamina.

30 La presente solicitud describe un medio de cultivo celular para mantener células madres embrionarias aviares pluripotentes o multipotentes, preferiblemente células madres embrionarias (ES) de pato pluripotentes o multipotentes, en cultivo en un estado no diferenciado. De acuerdo con una realización preferida, la presente solicitud describe un medio de cultivo celular para células madres embrionarias de pato que comprende un medio de cultivo basal suplementado con suero animal y suplementado con al menos IGF-1 y CNTF. De acuerdo con una
 35 segunda realización preferida, la presente solicitud describe un medio de cultivo celular para células madres embrionarias de pato que comprende un medio de cultivo basal suplementado con suero animal y suplementado con al menos IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R. De acuerdo con una tercera realización preferida, la presente solicitud describe un medio de cultivo celular para células madres embrionarias de pato que comprende un medio de cultivo basal suplementado con suero animal y suplementado con al menos IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF y FGF. Dichos medios son suficientes para el mantenimiento de dichas células ES de pato en cultivo durante al menos 7 días,
 40 preferiblemente durante al menos 20 días, preferiblemente durante al menos 100 días en un estado no diferenciado. Dichos medios de cultivo pueden comprender, además, opcionalmente al menos un compuesto seleccionado del grupo que comprende interleucina-11, cardiotrofina, oncostatina y factor inhibidor de la leucemia (LIF). Preferiblemente, dicho medio de cultivo comprende, además, un hidrolizado de proteínas de origen no animal tal como se ha descrito previamente, más preferiblemente, es hidrolizado de levaduras a una concentración 1X. El
 45 medio de cultivo de células ES aviares (preferiblemente de pato) puede comprender, además, una capa de células alimentadoras.

La presente solicitud describe un cultivo de células ES de pato sostenido que consiste esencialmente en células ES de pato no diferenciadas que expresan el fenotipo de células madre con las siguientes características:

- 50
- una elevada relación núcleo-citoplásmica,
 - una actividad de telomerasa endógena,
 - opcionalmente, células ES de pato pueden expresar uno o más marcadores ES adicionales tales como fosfatasa alcalina, marcadores SSEA-1, EMA-1, ENS1.

- Un tiempo de duplicación de aproximadamente alrededor de 40 horas a 37°C o 39°C.

Dichas células de pato no diferenciadas son capaces de mantener dicho fenotipo de célula madre cuando se desarrollan sobre células alimentadoras en un medio de cultivo para células madres embrionarias de pato tal como se describe previamente. Dichas células de pato no diferenciadas son útiles para producir patos quiméricos o transgénicos.

5 Por lo tanto, la presente solicitud describe un método para obtener un pato quimérico, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) introducir un cultivo de células ES de pato sostenido según se describe antes en la cavidad sub-germinal de un embrión de pato receptor; y
- 10 b) incubar el embrión obtenido en la etapa a) hasta la eclosión como un patito;
- c) seleccionar dicho patito quimérico que comprende células heterólogas que han colonizado a dicho patito.

La presente solicitud describe un método para obtener un pato quimérico genéticamente modificado, que comprende las etapas de:

- 15 a) introducir un cultivo de células ES de pato genéticamente modificado según se describe antes en la cavidad sub-germinal de un embrión de pato receptor; y
- b) incubar el embrión obtenido en la etapa a) hasta la eclosión como un patito;
- c) seleccionar dicho patito quimérico que comprende células heterólogas genéticamente modificadas que han colonizado a dicho patito.

20 La presente solicitud describe un la presente solicitud describe un método para obtener una progenie de dicho patito quimérico, en donde dicho método comprende las siguientes etapas:

- a) permitir que el patito quimérico seleccionado, obtenido en la etapa c) madure como un pájaro adulto;
- b) 25 criar dicho pájaro adulto que tiene células heterólogas, produciendo con ello una progenie del pájaro;
- c) seleccionar los pájaros de interés en la progenie.

30 La solicitud describe la etapa adicional de expresar un polipéptido heterólogo codificado por un vector de expresión comprendido en dichas células ES de pato genéticamente modificadas. Preferiblemente, el polipéptido heterólogo se suministra al fluido biológico de un pato, tal como la sangre, espermatozoides, orina o la clara de un huevo de ave en desarrollo producido por una hembra del pato genéticamente modificado.

Las células EBx® tienen todas las características arriba mencionadas y son útiles para la producción de materiales biológicos tales como vacunas virales y péptidos y proteínas recombinantes.

35 La presente invención proporciona también un procedimiento para replicar un virus en las líneas de células EBx® aviares diploides continuas, obtenidas mediante un procedimiento de la invención. Más preferiblemente, la invención proporciona un procedimiento para la replicación de un virus en las líneas de células EBx® aviares diploides continuas obtenidas mediante un procedimiento de la invención, líneas de células EBx® de pato, que comprende las etapas:

- infectar un cultivo de células EBx® aviar con un virus de interés; siendo dichas células EBx® aviares preferentemente cultivadas en medio exento de suero animal;
- 40 - cultivar células EBx® aviares infectadas con el fin de replicar dicho virus;
- recolectar el virus en el sobrenadante del cultivo celular y/o dentro de dichas células.

De acuerdo con una realización preferida, dicho procedimiento comprende las etapas de:

- a) proliferar dichas EBx® aviares en un recipiente de cultivo, en suspensión, en un medio exento de suero N° 1;
- 45 b) infectar dichas células con el virus seleccionado cuando la densidad celular es de al menos 1,5 millones

de células/ml;

c) opcionalmente, poco antes de la infección, simultáneamente con la infección o poco después de la infección, añadir al cultivo de células medio exento de suero N° 2; y

d) cultivar adicionalmente dichas células infectadas con el fin de permitir la replicación del virus; y

5 e) opcionalmente, recolectar dicho virus.

Dicho procedimiento de la invención puede comprender la etapa adicional de añadir enzima proteolítica en el medio de cultivo en condiciones que permitan la propagación del virus. La enzima proteolítica se selecciona del grupo que consiste en tripsina, quimotripsina, termolisina, pepsina, pancreatina, papaína, pronasa, subtilisina A, elastasa, furina y carboxipeptidasa. De acuerdo con una realización preferida, la enzima es tripsina. Preferiblemente, la enzima proteolítica es una proteína recombinante producida en un hospedador procariótico o en plantas (es decir: TrypZean). La enzima proteolítica se puede añadir antes, durante y/o después de la infección por el virus. Preferiblemente, la adición de enzima proteolítica se realiza después de la infección por el virus. La adición de enzima proteolítica en el medio de cultivo se puede realizar una vez al día, más de una vez al día o menos de una vez al día hasta la recolección del virus.

15 El término "virus", tal como se utiliza en esta memoria, incluye no sólo virus que se producen de forma natural, sino también virus atenuados, virus reordenados, cepas vacuna, así como virus recombinantes y vectores virales derivados de los mismos. El virus de la invención se selecciona preferiblemente del grupo que comprende virus de la viruela, ortomixovirus, paramixovirus, virus herpes, hepadnavirus, adenovirus, parvovirus, reovirus, circovirus, coronavirus, flavivirus, togavirus, birnavirus y retrovirus.

20 En una realización preferida, los virus, los vectores virales relacionados, partículas virales y vacunas virales pertenecen a la familia de poxviridae, y más preferiblemente a los chordopoxviridae. En una realización, el virus o los vectores virales relacionados, partículas virales y vacunas virales son un virus de la viruela, preferiblemente un virus de la viruela aviar seleccionado entre virus de la viruela del gallo (es decir, TROVAC), virus de la viruela del canario (es decir, ALVAC), virus de la juncopox, virus mynahpox, virus de la viruela de la paloma, virus de la psittacinepox, virus de la viruela de la codorniz, virus de la viruela del gorrión, virus de la viruela del estornino, virus de la viruela del pavo. De acuerdo con otra realización preferida, el virus es un virus vacuna seleccionado entre el virus de la vacuna cepa Lister-Elstree, virus vacuna modificado tal como el virus vacuna Ankara modificado (MVA) que puede obtenerse de ATCC (Número VR-1508 de ATCC), NYVAC (Tartaglia et al., 1992, Virology, 188:217-232), LC16m8 (Sugimoto et Yamanouchi, 1994, Vaccine, 12:675-681), CVI78 (Kempe et al., 1968, Pediatrics 42:980-985) y otros virus vacuna recombinantes o no recombinantes.

30 En otra realización preferida, los virus, los vectores virales relacionados, partículas virales y vacunas virales pertenecen a la familia de ortho-myxoviridae, en particular virus de la influenza. El virus de la influenza se selecciona del grupo que consiste en virus de la influenza humana, virus de la influenza aviar, virus de la influenza equina, virus de la influenza porcina, virus de la influenza felina. El virus de la influenza se selecciona preferiblemente en cepas A, B y C. Entre las cepas A, se pueden recitar virus con diferentes subtipos de hemoaglutinina y neuraminidasa tales como, sin limitación, H1N1, H2N2, H3N2, H4N2, H4N6, H5N1, H5N2, H7N7 y H9N2. Entre las cepas H1N1 se pueden recitar A/Puerto Rico/8/34, A/Nueva Caledonia/20/99, A/Pekín/262/95, A/Johannesburgo/282/96, A/Texas/36/91, A/Singapur, A/Islas Salomón/03/2006. Entre las cepas H3N2, se pueden recitar A/Panamá/2007/99, A/Moscú/10/99, A/Johannesburgo/33/94, A/Wisconsin/10/04. Entre las cepas B se pueden recitar, sin limitación, B/Puerto Rico/8/34, B/Johannesburgo/5/99, B/Viena/1/99, B/Ann Arbor/1/86, B/Memphis/1/93, B/Harbin/7/94, N/Shandong/7/97, B/Hong Kong/330/01, B/Yamanashi/166/98, B/Jiangsu/10/03, B/Malasia. El virus de la influenza de la invención se selecciona entre virus de tipo salvaje, aislados virales primarios obtenidos de individuos infectados, virus recombinante, virus atenuado, virus sensible a la temperatura, virus adaptado a baja temperatura, virus reordenado, virus tratado mediante ingeniería genética inversa. Cuando el virus de la invención es el virus de la influenza, el procedimiento de la invención comprende la etapa adicional de añadir enzima proteolítica al medio de cultivo en condiciones que permitan la propagación del virus. De acuerdo con una realización preferida, la enzima es tripsina. La concentración final de tripsina en un medio de cultivo celular oscila entre alrededor de 0,01 µg/ml hasta 10 µg/ml. Más preferiblemente, la concentración final de tripsina en un medio de cultivo celular oscila entre 0,01 y 10 usp/ml (usp: unidades de la Farmacopea de EE.UU.), de preferencia entre alrededor de 0,05 y 2 usp/ml, más preferiblemente entre alrededor de 0,3 y 1 usp/ml y, lo más preferiblemente, alrededor de 0,75 usp/ml.

55 En otra realización preferida, los virus, los vectores virales relacionados, las partículas virales y vacunas pertenecen a la familia de paramyxoviridae. Preferiblemente, el virus es un paramixovirus que se produce de forma natural o un paramixovirus recombinante seleccionado del grupo que comprende virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la rubeola, virus Sendai, virus respiratorio sincitial (RSV), para-influenza tipos I y III humana, virus de la peste bovina, virus del moquillo canino, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la para-influenza de pato. De

acuerdo con una realización preferida, el virus es virus del sarampión o un virus del sarampión recombinante. De acuerdo con otra realización preferida, el virus es el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) o un NDV recombinante. Un ejemplo de una cepa de NDV es la cepa La Sota. Cuando el virus de la invención es NDV, el procedimiento de la invención comprende preferiblemente la etapa adicional de añadir enzima proteolítica en el medio de cultivo en condiciones que permitan la propagación del virus. De acuerdo con una realización preferida, la enzima es tripsina. La concentración final de tripsina en un medio de cultivo celular está comprendida entre alrededor de 0,01 µg/ml hasta 10 µg/ml. Más preferiblemente, la concentración final de tripsina en un medio de cultivo celular está comprendida entre 0,01 y 10 usp/ml (usp: unidades de la Farmacopea de EE.UU.), de preferencia entre alrededor de 0,3 y 1 usp/ml, más preferiblemente entre alrededor de 0,4 y 0,75 usp/ml. De manera interesante, las líneas celulares EBx® de la invención que pueden crecer en adherencia son útiles para realizar la titulación del virus y, preferiblemente, la titulación de NDV en un ensayo en placa. De hecho, a diferencia de CEFs y fibroblastos DF1 de pollo, para los que no fue posible observar efecto citopático alguno, el desarrollo del virus en células EBx® conduce a la formación de células gigantes características. Además, partículas virales NDV pueden determinarse mediante un ensayo de hemoaglutinación. Por lo tanto, la invención pertenece también al uso de células EBx® de la invención para la titulación de virus tales como el virus NDV.

En otra realización preferida, los virus, los vectores virales relacionados, las partículas virales y vacunas pertenecen a la familia de togaviridae. Preferiblemente, el virus es un alfavirus que se produce de forma natural o un alfavirus recombinante seleccionado del grupo que comprende virus Sinbis, virus del bosque Semliki, virus O'nyong'nyong, virus Chikungunya, virus Mayaro, virus del río Ross, virus de la encefalitis equina del este, virus de la encefalitis equina del oeste, virus de la encefalitis equina venezolana.

En otra realización preferida, los virus, los vectores virales relacionados, las partículas virales y las vacunas pertenecen a la familia de herpesviridae. Preferiblemente, el virus es un virus de la enfermedad de Marek que se produce de forma natural o un virus de la enfermedad de Marek recombinante. El virus de la enfermedad de Marek (MDV) se selecciona preferiblemente entre las cepas de vacuna de licencia de MDV tales como: FC126 (HTV), SB-1, 301B/1, CVI988 clon C, CVI988/C/R6, CVI988/Rispens, R2/23 (Md/11/75).

En otra realización preferida, los virus, los vectores virales relacionados, las partículas virales y vacunas pertenecen a la familia de hepadnaviridae. Preferiblemente, el virus es un hepadnavirus que se produce de forma natural o un hepadnavirus recombinante, preferiblemente seleccionado entre hepadnavirus aviar y humano. El hepadnavirus aviar se selecciona preferiblemente entre el grupo que consiste en virus de la hepatitis B de pato (DHBV), virus de la hepatitis B de garza (HHBV) y de ganso de las nieves (SGHBV).

En otra realización preferida, los virus, los vectores virales relacionados, las partículas virales y vacunas pertenecen a la familia de birnaviridae, en particular el virus de la enfermedad bursal infecciosa.

En otra realización preferida, los virus, los vectores virales relacionados, las partículas virales y vacunas pertenecen a la familia de flaviviridae, en particular el virus Dengue, virus de la encefalitis japonesa y virus del oeste del Nilo.

En otra realización preferida, los virus, los vectores virales relacionados, las partículas virales y vacunas pertenecen a la familia de coronaviridae, en particular el virus de la bronquitis infecciosa.

En otra realización preferida, los virus, los vectores virales relacionados, las partículas virales y vacunas pertenecen a la familia de circoviridae, en particular el virus de la anemia de pollo.

En otra realización preferida, los virus, los vectores virales relacionados, las partículas virales y vacunas pertenecen a la familia de retroviridae. Preferiblemente, el virus es un retrovirus que se produce de forma natural, seleccionado entre virus de la retículo-endoteliosis, virus de la anemia infecciosa del pato, virus de la necrosis del bazo por parásitos chupadores o un retrovirus recombinante de los mismos.

En otra realización preferida, los virus, los vectores virales relacionados, las partículas virales y vacunas pertenecen a la familia de parvoviridae. Preferiblemente el virus es un parvovirus que se produce de forma natural, tal como parvovirus de pato o un parvovirus recombinante de los mismos.

En otra realización preferida, los virus, los vectores virales relacionados, las partículas virales y vacunas pertenecen a la familia de adenoviridae. Preferiblemente el virus es un adenovirus que se produce de forma natural, seleccionado entre adenovirus del gallo, adenovirus del ganso, adenovirus del pato y adenovirus de la paloma, o un adenovirus recombinante de los mismos. Ejemplos de adenovirus del gallo son adenovirus 1 del gallo (CELO), adenovirus 5 del gallo (340), adenovirus 4 del gallo (KR95), adenovirus 10 del gallo (CFA20), adenovirus 2 del gallo (P7-A), adenovirus 3 gallo (75), adenovirus 9 del gallo (A2-A), adenovirus 11 del gallo (380), adenovirus 6 del gallo (CR119), adenovirus 7 del gallo (YR36), adenovirus 8a del gallo (TR59), adenovirus 8b del gallo (764) y virus del síndrome de la caída de la puesta. Ejemplos de adenovirus de ganso son adenovirus 1 de ganso, adenovirus 2 de ganso, adenovirus 3, de ganso. Un ejemplo de adenovirus de pato es adenovirus 2 de pato. Un ejemplo de

adenovirus de paloma es adenovirus 1 de paloma. Virus recombinantes incluyen, pero no se limitan a vectores virales que comprenden un gen heterólogo. En algunas realizaciones, se proporciona una función o funciones de ayuda (helper) para la replicación de los virus por parte de la célula EBx® hospedadora, un virus helper o un plásmido helper. Vectores representativos incluyen, pero no se limitan a los que infectarán a células de aves o mamíferos.

La presente solicitud describe el uso de células EBx® de la invención para replicar bacterias intracelulares tales como Chlamydia, Rickettsia o Coxiella.

Las células EBx® obtenidas mediante un procedimiento de la invención también se pueden utilizar para producir proteínas y péptidos recombinantes. La invención se refiere también a un método para la producción de proteínas y péptidos recombinantes que incluye las etapas de: (i) modificar genéticamente a las células EBx®, obtenidas mediante un procedimiento de la invención, mediante transfección transitoria o estable de un vector de expresión; (ii) opcionalmente, seleccionar células EBx® que expresan dichas proteínas o péptidos recombinantes; (iii) y la purificación de dichos péptidos o proteínas. Se describen péptidos y proteínas producidos en células EBx®.

El recipiente de cultivo de la invención se selecciona más preferiblemente entre un biorreactor de tanque agitado continuo, biorreactor Wave™, biorreactor Bello™, matraz de agitación, matraz y una factoría celular. Típicamente, las células se aumentan desde un vial de banco de células maestro o de trabajo a través de diferentes tamaños de matraces en T, frascos rotatorios o biorreactor Wave™ y, preferiblemente, finalmente, a biorreactores. La suspensión de células resultante se alimenta entonces típicamente a un biorreactor de producción de semillas (típicamente de un volumen de 20-30 L) para el cultivo adicional y, en algunas realizaciones, a un biorreactor de producción mayor (típicamente de 150-180 L de volumen y superior). La relación de volumen del segundo biorreactor (mayor) al biorreactor de semillas depende del grado al que se propague la línea celular en el primer biorreactor, pero típicamente es de 3:1 a 10:1, p. ej. está en el intervalo de (6-8):1. De acuerdo con una realización preferida, el recipiente de cultivo es un biorreactor de tanque agitado continuo que permite el control de la temperatura, ventilación, pH y otras condiciones controladas, y que está equipado con entradas apropiadas para introducir las células, oxígeno estéril, diversos medios para el cultivo y salidas para separar células y medios para agitar el medio de cultivo en el bioreactor.

De acuerdo con la presente invención, "medio exento de suero" (SFM) significa un medio de cultivo celular listo para ser utilizado, es decir, que no requiere la adición de suero animal, permitiendo la supervivencia de las células y el desarrollo de las células. El medio no está necesariamente definido químicamente, y puede contener hidrolizados de diverso origen, de plantas o levaduras, por ejemplo. Preferiblemente, dicho SFM se califica como de "origen no animal", es decir, no contiene componentes de origen animal o humano (estado FAO: "exento de origen animal"). En el SFM, las proteínas del suero nativas son reemplazadas por proteínas recombinantes. Alternativamente, el medio SFM de acuerdo con la invención no contiene proteína (medio PF: "medio exento de proteína") y/o está químicamente definido (medio CDM: "medio químicamente definido"). Medios SFM presentan varias ventajas: (i) la primera de todas es el cumplimiento con las normas de medios de este tipo (de hecho, no existe riesgo alguno de contaminación por parte de agentes adventicios tales como BSE, virus); (ii) la optimización del proceso de purificación; (iii) la mejor reproducibilidad en el procedimiento debido al medio mejor definido. Ejemplos de medios SMF comercialmente disponibles son: VP SFM (InVitrogen Ref 11681-020, catálogo 2003), Opti Pro (InVitrogen Ref 12309-019, catálogo 2003), Episerf (InVitrogen Ref 10732-022, catálogo 2003), Pro 293 S-CDM (Cambrex ref 12765Q, catálogo 2003), LC17 (Cambrex Ref BESP302Q), Pro CHO 5-CDM (Cambrex ref12-766Q, catálogo 2003), HyQ SFM4CHO (Hyclone Ref SH30515-02), HyQ SFM4CHO-Utility (Hyclone Ref SH30516.02), HyQ PF293 (Hyclone ref SH30356.02), HyQ PF Vero (Hyclone Ref SH30352.02), medio Excell 293 (SAFC Biosciences ref 14570-1000M), medio Excell 325 PF exento de proteína (SAFC Biosciences ref 14335-1000M), medio Excell VPRO (SAFC Biosciences ref 14560-1000M), medio Excell 302 exento de suero (SAFC Biosciences ref 14312-1000M), Excell 65319, Excell 65421, Excell 65625, Excell 65626, Excell 65627, Excell 65628, Excell 65629 (JRH Biosciences), Excell MDCK SFM (SAFC-Biosciences Ref. 14581C), Excell MDCK Prod (Ref. M3678), Gene Therapy Medium 3 (exento de componente animal) (SIGMA-Aldrich, ref. G-9916 o Excell GTM-3) (nombrado aquí en lo que sigue medio G9916), HYQ CDM4 HEK-293 (Hyclone Ref. SH30859), HYQ SFM4 HEK-293 (HYCLONE Ref. SH30521), AEM (InVitrogen). De acuerdo con la primera realización preferida, el medio exento de suero N°1 y el medio exento de suero N° 2 son el mismo medio. De acuerdo con una segunda realización preferida, el medio exento de suero N°1 y el medio exento de suero N° 2 tienen una composición diferente.

El procedimiento de la invención abarca la separación de la totalidad o de una parte del medio exento de suero 1, seguido por su sustitución por parte de medio exento de suero N° 2. Sin embargo, es más conveniente separar una fracción sustancial (p. ej. de hasta aproximadamente 50%) del medio exento de suero 1 y luego reponerlo por el medio exento de suero N° 2 al tiempo que sigue separando medio 1, p. ej. a través del filtro de centrifugadora. De acuerdo con una realización preferida, medio exento de suero N° 2 es directamente añadido al medio exento de suero N° 1 sin la separación de una parte del medio exento de suero N° 1. Entre 0,25 y 10 volúmenes de medio exento de suero N° 2 se añaden a 1 volumen de medio exento de suero N° 1. En una realización preferida, entre

alrededor de 0,5 y 8 volúmenes de medio exento de suero N° 2 se añaden a 1 volumen de medio exento de suero N° 1. En una realización más preferida, entre alrededor de 3 y 6 volúmenes de medio exento de suero N° 2 se añaden a 1 volumen de medio exento de suero N° 1.

5 El medio exento de suero N° 1 y/o el medio exento de suero N° 2 se pueden suplementar con al menos un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos, lípidos, ácidos grasos, colesterol, vitaminas, hidratos de carbono, hidrolizados de proteínas de origen no animal y una mezcla de los mismos.

10 Alternativamente, el procedimiento de replicar un virus de la invención es un proceso en tandas alimentadas que comprende la etapa adicional de alimentar las células con al menos un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos, lípidos, vitaminas, hidratos de carbono, hidrolizados de proteínas de origen no animal, tensioactivo y una mezcla de los mismos. De acuerdo con una primera realización preferida, la alimentación se produce durante las etapas a) a d) del procedimiento de la invención de la replicación de un virus, alternativamente sólo durante las etapas b) a d) o, alternativamente, sólo durante la etapa d). La alimentación puede producirse sobre una base diaria o sobre una base continua. Cuando la alimentación es discontinua, la alimentación puede producirse una vez al día, más de una vez al día o menos de una vez al día.

15 El medio SFM comprende un cierto número de ingredientes, que incluyen aminoácidos, vitaminas, sales orgánicas e inorgánicas, fuentes de hidratos de carbono, estando presente cada uno de los ingredientes en una cantidad que soporta el cultivo de una célula in vitro. Con el fin de mejorar el crecimiento de las células o la productividad viral, se añaden al medio SFM ingredientes adicionales.

20 La elección de un aminoácido o aminoácidos a añadir al cultivo celular puede determinarse mediante un análisis del consumo de aminoácidos por parte de las células en el cultivo; dicho consumo varía de acuerdo con la especie celular. De acuerdo con una realización preferida, los aminoácidos añadidos al medio pueden seleccionarse del grupo que consiste en asparagina y glutamina, o una mezcla de los mismos. En una realización más preferida, glutamina se añade al cultivo de células EBx de pollo, y la alimentación de glutamina se realiza durante las etapas a) a d) para mantener la concentración de glutamina en el medio entre alrededor de 0,05 mM y alrededor de 5 mM, preferiblemente entre alrededor de 1 mM y alrededor de 3 mM, y lo más preferiblemente alrededor de 2 mM. En una realización preferida, la alimentación de glutamina se produce sobre una base continua. De manera interesante, células EBx® de pato no consumen mucha glutamina, ya que las células de pato tienen la capacidad de sintetizar glutamina. Por lo tanto, la glutamina puede o puede no ser añadida al cultivo de células EBx de pato.

30 De acuerdo con una realización preferida, los hidratos de carbono añadidos al medio se seleccionan del grupo que consiste en D-glucosa, D-sacarosa y D-galactosa o una mezcla de las mismas. De acuerdo con una realización más preferida, el hidrato de carbono añadido es D-glucosa. La alimentación de D-glucosa se realiza durante las etapas a) a d), más preferiblemente entre b) y d) para mantener la concentración de D-glucosa en el medio entre alrededor de 0,5 g/l y 25 g/l de D-glucosa, preferiblemente entre alrededor de 1 g/l y 10 g/l de D-glucosa, preferiblemente alrededor de 2 a 3 g/l de D-glucosa. En una realización preferida, la alimentación de D-glucosa se produce sobre una base continua.

40 De acuerdo con una realización preferida, los lípidos se seleccionan del grupo que consiste en colesterol, esteroides y ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoléico, ácido linolénico y sus derivados o una mezcla de los mismos. Más preferiblemente, los ácidos grasos son de SIGMA-ALDRICH (Ref. F7050) y al medio de cultivo se añade alrededor de 0,35 µl/ml de la disolución de ácidos grasos.

45 El medio puede contener sustancias auxiliares tales como sustancias tampón tales como bicarbonato de sodio, estabilizadores de la oxidación, estabilizadores para contrarrestar el esfuerzo mecánico o inhibidores de proteasa. Si se requiere, al medio se puede añadir un tensioactivo no iónico tal como polipropilenglicol (PLURONIC F-61, PLURONIC F-68, SYNPERONIC F-68, PLURONIC F-71 o PLURONIC F-108) en calidad de un agente antiespumante. Estos agentes se utilizan generalmente para proteger a las células frente a los efectos negativos de la ventilación, ya que, sin la adición de un tensioactivo, las burbujas de aire ascendentes y que estallan pueden conducir a dañar a aquellas células que están situadas sobre la superficie de estas burbujas de aire ("borboteo"). La cantidad de tensioactivo no iónico oscila preferiblemente entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 10 g/L, típicamente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 g/L. De acuerdo con otra realización de la invención, la concentración de tensioactivo en el medio de cultivo celular puede modificarse para adaptar (es decir, aumentar o disminuir) el tamaño de todos los grumos de células.

55 De acuerdo con una realización del procedimiento de replicar un virus de la invención, la adición de medio exento de suero N° 2 al cultivo celular se realiza después de la etapa de infección b), preferiblemente entre alrededor de 0,5 y 4 horas después de la etapa b), y más preferiblemente alrededor de 1 hora después de la etapa b). De acuerdo con otra realización de la invención, la adición de medio exento de suero N° 2 al cultivo celular se realiza antes de la etapa de infección b), preferiblemente entre alrededor de 0,5 y 4 horas después de la etapa b), y más

- preferiblemente alrededor de 1 hora antes de la etapa b). De acuerdo con otra realización de la invención la adición de medio exento de suero N° 2 al cultivo celular se realiza simultáneamente a la etapa de infección b). La infección viral de la etapa b) se lleva a cabo a una m.d.i (multiplicidad de infección) de aproximadamente 10 a 10⁶, preferiblemente 10⁻¹ a 10⁻⁶, más preferiblemente de aproximadamente 10⁻² a 10⁻⁵ y más preferiblemente de aproximadamente 10⁻⁴. El experto en la técnica determinará la m.d.i. óptima de acuerdo con el tipo de virus. En la etapa c), las células infectadas se cultivan preferiblemente durante al menos 24 h, al menos 48 h, al menos 72 h, al menos 96 h, al menos 120 h, al menos 144 h. Cuando el virus es un virus de la viruela, las células infectadas se cultivan al menos durante 144 h.
- En el procedimiento de la invención, el cultivo de las células de la etapa a) se lleva a cabo mediante un cultivo en tandas, cultivo en tandas repetido, cultivo en tandas alimentadas o cultivo de perfusión. Más preferiblemente, el cultivo de las células de la etapa a) se realiza mediante cultivo en tandas alimentadas. La infección en la etapa b) se realiza cuando la densidad celular es de al menos alrededor de 4 millones, preferiblemente 6 millones de células/ml, más preferiblemente 8 millones de células /ml en el proceso discontinuo o en tandas alimentadas. Cuando se utiliza un proceso de perfusión, la infección en la etapa b) se realiza cuando la densidad celular es de al menos 8 millones de células/ml, preferiblemente en torno a 9 a 10 millones de células/ml o incluso superior.
- El pH del medio de cultivo exento de suero en las etapas a), b), c) y d) se vigila preferiblemente mediante el bio-reactor. El pH deberá estar en un intervalo de 6,5 a 7,8, de preferencia alrededor de 6,8 a 7,5 y más preferiblemente alrededor de 7,2.
- En el procedimiento de la invención, la etapa d) dura 1 a 10 días antes de la recolección. De acuerdo con una realización preferida, la etapa d) dura 2 a 5 días antes de la recolección. El tiempo de recolección (etapa e) se define de acuerdo con la densidad celular en el recipiente de cultivo. Los autores de la invención han encontrado ahora que el tiempo óptimo para la recolección de los virus es de dos días después de que la densidad de células viables haya alcanzado su nivel óptimo y haya comenzado a disminuir debido a la infección viral.
- El cultivo de las células se realiza a una temperatura comprendida entre 32°C y 39°C, dependiendo del tipo de virus. Para la producción del virus de la influenza y del virus de la viruela, la infección del cultivo celular se realiza preferiblemente a 33°C.
- Células EBx® tienen la capacidad de crecer en cultivo en suspensión con células formando grumos en grupos sueltos de unas pocas células, hasta más de cien o cientos de células. Sin estar ligados por una teoría, el tamaño de los grumos puede variar de acuerdo con la composición del medio de cultivo celular. Por ejemplo, la presencia de tensioactivo tal como polipropilenglicol (PLURONIC F-61, PLURONIC F-68, SYNPERONIC F-68, PLURONIC F-71 o PLURONIC F-108), la agitación, la concentración de iones divalentes tales como Mg²⁺ y Ca²⁺, pueden tener un efecto sobre el tamaño de los grumos. El autor de la invención ha encontrado ahora que el rendimiento viral puede aumentarse permitiendo que las células EBx® de la invención se agreguen entre sí para formar grumos durante al menos la etapa a) del procedimiento. Durante el aumento del vial del banco de células maestro y de trabajo a través de los diversos tamaños de matraces en T o frascos rodantes a biorreactores, las células en suspensión se hacen pasar generalmente a un recipiente mayor, ya sea mediante dilución en medio de reciente aportación o mediante centrifugación seguida de una re-suspensión del sedimento de células en un medio de reciente aportación. El autor de la invención ha encontrado que durante los pasajes de las células, se recomienda mantener grandes grumos de células en el cultivo. Para ello es mejor no disgregar los grumos de células con el fin de mejorar la replicación del virus en células EBx®. Por ejemplo, durante las fases iniciales de cultivo de la etapa a) en matraces T o frascos rodantes, se recomienda diluir el cultivo celular en el pasaje de las células a recipiente o recipientes mayores, y no se recomienda centrifugar ni disgregar los grumos de células mediante pipeteado o agitación. Sin embargo, grumos demasiado grandes pueden ser sub-óptimos para una elevada producción viral. Por consiguiente, el experto en la técnica definirá si una disgregación parcial de los grumos, mediante pipeteado o agitación, durante los pasajes iniciales de las células de la etapa a) puede mejorar el rendimiento viral. De acuerdo con una realización preferida, los virus y, preferiblemente, MVA, ALVAC y virus de la viruela del gallo se obtienen mediante un procedimiento de la invención que incluye la etapa a) de proliferar EBx® formando grumos en agregados sueltos de unas pocas células hasta más de al menos cien células, al menos doscientas células, al menos quinientas células, al menos mil o miles de células.
- Los autores de la invención han encontrado que el tamaño de grumos de células de EBx®, preferiblemente grumos de células EBx® de pato, puede depender de la concentración de iones Mg²⁺ y/o Ca²⁺ en medio de cultivo de células independiente de anclaje. Dado que grumos demasiado grandes pueden ser sub-óptimos para una producción viral alta, el tamaño de los grumos se puede vigilar ajustando la concentración de Mg²⁺ y Ca²⁺ en el medio de cultivo celular.
- Para células EBx® de pato, el medio de cultivo celular contiene preferiblemente una concentración de Mg²⁺ comprendida entre 0,5 mM y 2,5 mM, de preferencia alrededor de 1,6 mM y una concentración de Ca²⁺

comprendida entre 0,01 mM y 0,5 mM, preferiblemente alrededor de 0,1 mM.

La solicitud describe el virus obtenible mediante un procedimiento de la invención. La presente invención se refiere también a la vacuna que contiene el virus de la invención. El procedimiento de fabricar una vacuna viral comprende el proceso de replicar un virus de acuerdo con la invención, en el que la etapa e) de la recolección del virus comprende al menos una etapa seleccionada entre filtrar, concentrar, congelar y establecer mediante adición de agente estabilizante. La recolección del virus se realiza de acuerdo con tecnologías bien conocidas por el experto en la técnica. De acuerdo con una realización preferida, la etapa de recolectar dicho virus comprende recoger sobrenadante del cultivo celular obtenido de la centrifugación del cultivo celular, después filtrar, concentrar, congelar y estabilizar el preparado de virus mediante la adición de un agente estabilizante. Por ejemplo, para el virus de la influenza, véase Furminger, en Nicholson, Webster y Hay (comps.) Textbook of influenza, capítulo 24, págs. 324-332.

El procedimiento de fabricar una vacuna viral de acuerdo con la invención puede comprender también la etapa adicional de inactivación del virus recolectado. La inactivación se realiza preferiblemente mediante tratamiento con formaldehído, beta-propiolactona, éter, éter y detergente (es decir tal como Tween 80™, bromuro de acetil-trimetil-amonio (CTAB) y Triton N102, deoxicolato de sodio y trifostato de (N-butilo).

De acuerdo con otra realización, la solicitud describe un procedimiento para la preparación de proteínas antigénicas virales a partir del virus obtenible mediante un procedimiento de la invención, comprendiendo dicho procedimiento las etapas adicionales de:

- a) opcionalmente, incubar sobrenadante del cultivo celular que comprende virus entero con una enzima de restricción de ácido desoxirribonucleico, preferiblemente DNAsas (véase la clasificación EC3.1.21 y EC3.1.22) y nucleasas (véase la clasificación EC3.1.30 y EC3.1.31). Preferiblemente, la enzima de digestión de ADN es benzonasa (benzona nucleasa) o DNasa I;
- b) adición de detergente catiónico. Ejemplos de detergente catiónico son, sin limitación: sal de cetil-trimetil-amonio tal como CTAB, sal de miristil-trimetil-amonio, lipofectina, DOTMA y Tween™;
- c) aislamiento de proteínas antigénicas. Esta última etapa se puede realizar mediante centrifugación o ultrafiltración.

El virus en la vacuna puede estar presente en forma de partículas de virus intactas o como partículas de virus desintegradas. De acuerdo con una realización, la vacuna es una vacuna exterminada o inactivada. De acuerdo con otra realización, la vacuna es una vacuna viva atenuada, en donde dichas vacunas comprenden principalmente sobrenadante de cultivo de células EBx obtenible mediante el procedimiento de la invención, preferiblemente sin suero, opcionalmente filtrado y/o concentrado y que comprende dicho virus. De acuerdo con una tercera realización, la vacuna comprende proteínas antigénicas virales obtenibles de un virus preparado de acuerdo con el procedimiento de la invención.

La invención hace posible proporcionar una vacuna que comprende una línea celular infectada EBx®, preferiblemente EBx® de pato, obtenible mediante el procedimiento de la invención, y en donde la línea celular infectada EBx®, preferiblemente EBx® de pato, se recolecta en la etapa d).

La vacuna puede comprender el virus en combinación con sustancias farmacéuticamente aceptables que aumentan la respuesta inmune. Ejemplos no limitantes de sustancias que aumentan la respuesta inmune comprenden coadyuvante de Freund incompleto, saponina, sales de hidróxido de aluminio, lisolecitina, polioles plutónicos, polianiones, péptidos, bacilos Calmette-Guerin (BCG) y Corynebacterium parvum. Un ejemplo de adyuvante sintético es QS-21. Además, para potenciar la respuesta inmune de la vacuna se pueden utilizar proteínas inmunoestimulantes (interleucinas IL1, IL2, IL3, IL4, IL12, IL13, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, ...).

La vacuna es preferiblemente una formulación líquida, un preparado congelado, un preparado deshidratado y congelado, opcionalmente adaptado a la vía de administración intranasal.

La vacuna es de uso para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de un ser humano o un animal infectado por el virus previamente listado. Preferiblemente, la vacuna viral es preferiblemente de uso para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de un ser humano infectado por un virus seleccionado entre viruela, influenza, sarampión, paperas, virus de la rubeola, RSV. Alternativamente, la vacuna es preferiblemente de uso para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de un animal infectado por un virus seleccionado entre influenza, virus de la enfermedad de Newcastle, virus del síndrome de caída de la puesta, enfermedad bursal infecciosa, virus de la bronquitis infecciosa, virus del moquillo canino, virus de la anemia de pollos. La vacuna viral recombinante de la invención también puede utilizarse para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de enfermedades crónicas, tales como cáncer y enfermedades

infecciosas tales como SIDA.

Las líneas celulares EBx® son útiles para generar y producir virus re-ordenados. El virus con un genoma segmentado tal como el virus de la influenza puede ser re-ordenado. Cuando se infectan simultáneamente células EBx® con al menos dos cepas diferentes de virus de la influenza, una mezcla de genoma segmentado procedente de dos cepas diferentes está presente en la misma célula hospedadora. Durante la reunión del virus, teóricamente se puede generar cualquier combinación de segmentos genómicos. Virus re-ordenado específico puede así aislarse seleccionando o eliminando, con un anticuerpo por ejemplo, virus con un rasgo deseado (véase Kilnourne E. D. en Plotkin SA y Mortiner E.A. Comps. Vaccines 1994). Las líneas celulares EBx® también son útiles para generar y producir virus de la influenza mediante genética inversa (véase Enami, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 3802-3805 (1990); Enami y Palese, J. Virol. 65:2511-2513 (1991); Luytjes, Cell 59:1107-1113 (1989)).

La presente solicitud describe el uso de líneas de células EBx® de la invención como un sustrato celular para realizar la titulación del virus. Células EBx® reemplazarán eficazmente a los actuales sistemas celulares tales como huevos embrionados, CEFs, células DF1 y otros, utilizados para determinar el título de una disolución viral. Preferiblemente, la titulación viral se realiza por el método TCID50 (Reed L. Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27, 493-97).

La solicitud describe el uso de líneas celulares EBx® de la invención como un sustrato de células para realizar un ensayo sanitario.

La solicitud describe la composición diagnóstica que contiene virus de la invención o constituyentes de los mismos.

Los ejemplos que siguen a continuación explican la invención con mayor detalle. Los siguientes preparados y ejemplos se proporcionan para permitir a los expertos en la técnica comprender de manera más clara y poner en práctica la presente invención. Sin embargo, la presente invención no está limitada en el alcance por las realizaciones ejemplificadas, que pretenden ser ilustraciones de aspectos individuales de la invención solamente, y métodos que son funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las ya descritas en esta memoria, resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción que antecede y de los dibujos que se acompañan. Modificaciones de este tipo pretenden caer dentro del alcance de las reivindicaciones anejas. Para el resto de la descripción, se hará referencia a la leyenda de las figuras que aparecen a continuación.

Figuras

FIGURA 1: Células EBX de pollo independientes de anclaje

Figura 1A: Células Valo EBv13 de pollo independientes de anclaje en medio exento de suero. Células EBv13 se cultivaron a 37°C en medio Excell 65319 (SAFC) exento de suero en suspensión. Las células EBv13 tienen un tamaño homogéneo y crecen en grumos sueltos en el cultivo. El tiempo de duplicación de la población es de aproximadamente 16-18 horas y la densidad celular en matraces agitados era de aproximadamente 4-5 millones de células/ml.

Figura 1B: Células EB Línea 0 de pollo independientes de anclaje en medio exento de anclaje

Células EB Línea 0 se cultivaron a 39°C en medio Excell 66444 (SAFC) exento de suero en suspensión. Células EB Línea 0 tienen un tamaño homogéneo y crecen en grumos sueltos.

FIGURA 2: Células Valo EBv13 de pollo expresan un alto nivel de telomerasa

Células EBv13 en el pasaje p193 expresan un alto nivel de telomerasa en el mismo orden de magnitud que células EB14-O74 de pollo (véase el documento WO03/076601) en el pasaje p164 (Banco de células Maestro: MCB) o en el pasaje p184 (Banco de células de Trabajo: WCB). Células madres embrionarias murinas (mES) se utilizaron como un control positivo y fibroblastos de ratón (FED) se utilizaron como un control negativo.

FIGURAS 3A y 3B: Susceptibilidad de Valo EBv13 de pollo al virus de la viruela

EBv13 (pasaje 188) fueron sembradas a razón de 0,4x10⁶ células/ml en matraces F175 de 100 mL en 40 ml de Medio Excell SFM 65319 o Medio SFM G9916 (SAFC) suplementado con glutamina 4 mM. El crecimiento de las células y la infección con MVAGFP (m.d.i. 10⁻² TCID50/célula) se realizaron a 37°C. Una hora post-infección se añadieron 60 ml de medio reciente.

Figura 3A: cinética de la densidad celular en medio Excell SFM 65319 o medio SFM G9916 (SAFC).

Figura 3B: Productividad de MVA expresada en TCID50/ml en medio Excell SFM 65319 o medio SFM G9916 (SAFC).

FIGURA 4: Análisis por microscopía electrónica de transmisión de células EBx de pato

5 El análisis por microscopía electrónica de transmisión de células dEBx se realizó por el Dr. A. Rivoire (Lyon, Francia). Células EBx de pato exhiben una morfología típica de células madres embrionarias (es decir, elevada relación núcleo-citoplásmica) que se asemeja al fenotipo de células madres embrionarias murinas y células EB14 VIVALIS descritas en el documento WO2006/108846. Células EBx de pato son pequeñas células redondas con un gran núcleo y nucléolo, con cortos pseudópodos que se extienden desde la membrana plasmática. Son altamente metabólicamente activas con un citoplasma rico en ribosomas y mitocondrias.

10 FIGURAS 5A y 5B: Expresión de telomerasa en líneas celulares EBx de pato

Se investigó la expresión de telomerasa durante diferentes fases de establecimiento de células Ebx de pato utilizando el kit de detección de telomerasa de Roche (Telomerase OCR ELISA).

15 Figura 5A: se encuentra que la telomerasa está altamente expresada en diferentes líneas celulares Ebx de pato adherentes, tal como en células EBv13 de pollo. Células epiteliales de pato, utilizadas como un control negativo, no expresan telomerasa.

Figura 5B: durante el proceso de establecimiento de células Ebx de pato en suspensión se mantiene un alto nivel de expresión de telomerasa. El alto nivel de telomerasa fue investigado en células Ebx de pato durante la privación de alimentadores (con o sin células alimentadoras) durante el proceso de adaptación de células EB26 de pato a la suspensión y después de la privación del suero de dEB24 y dEB26.

20 Células Ebx de pato tales como EB24 y EB26 expresan un alto nivel de telomerasa tal como células EB14 de pollo. EB66 de pato expresan también un alto nivel de telomerasa (datos no mostrados).

FIGURAS 6A y 6B: Células EBx® de pato no exhiben actividad de transcriptasa inversa endógena

25 Figura 6A: la expresión de transcriptasa inversa endógena se investigó mediante análisis F-PERT directo (Lovatt et al., 1999, J. Virol. Methods, 82:185-200) en células Clean (FRANCIA). Líneas celulares EBx® de pato, EB26 y EB5-1, no exhiben actividad de transcriptasa inversa (RT) endógena alguna. Se detectó un alto nivel de actividad de RT en cultivos celulares EB14 y EBv13 de pollo (a diferentes pasajes) así como, en menor medida, en fibroblastos embrionarios de pollo (CEF) derivados de la raza de pollo libre de patógenos específica (SPF). Células CEM que son RTasa negativas, se utilizaron como un control negativo para ajustar el límite de detección del ensayo.

30 Figura 6B: la presencia de partículas retrovirales endógenas, ya sea replicativas (es decir, competentes para la replicación) o no replicativas, en el sobrenadante del cultivo celular de células EBx de pato y pollo se investigó mediante un ensayo ELISA que detecta el antígeno P27 de la cápside principal de la leucosis aviar. Líneas celulares EBx de pato, EB26 y EB5-1, así como EBv13 de pollo no secretan antígeno P27 de ALV. En oposición, células EB14 de pollo expresan el antígeno P27 de ALV.

35 FIGURAS 7A y 7B: Células EBx de pato no segregan virus de la leucosis aviar (ALV) replicativo

El ensayo en co-cultivo de células EBx de pato con la línea celular QT6 de codorniz, que se sabe que es sensible a ALVs endógenos y exógenos, se realizó en Bioreliance (Reino Unido) para detectar la presencia de virus de pato replicativos endógenos.

Figura 7A: describe el principio del co-cultivo de QT6.

40 Figura 7B: la presencia de virus replicativo se detecta mediante ensayo ELISA que detecta el antígeno P27 de la cápside principal de la leucosis aviar.

El ensayo demuestra que ninguna de las células EBx® de pato sometidas a ensayo (dEB26 y dEB51) secretan ALV replicativo. El virus RAV-1, que se sabe replica en QT6, se utilizó como un control positivo.

45 FIGURA 8: Expresión en la superficie celular de receptores SAα2-3 y SAα2-6 en líneas celulares EBx de pato y EB14 de pollo

Las células se incuban con lectinas marcadas con digoxigenina: lectina aglutinina de Sambuca nigra se une específicamente a Sia2-6Gal, mientras que lectina aglutinina de Maackia amurensis se une específicamente a Sia2-3Gal. Lectinas que se unen a células son reveladas con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con FITC de acuerdo con técnicas bien conocidas por el experto en la técnica. Células marcadas con FITC se numeran con un

clasificador de células fluorescentes (FACS). Se ha descrito que moléculas SA α 2-3 y SA α 2-6 son receptores de los virus de la influenza aviar y humana, respectivamente. Casi todas las células EBx de pato expresan altamente receptores de la superficie celular SA α 2-3 y SA α 2-6.

FIGURAS 9A y 9B: Propagación del virus MVA-GFP en células EBx de pato infectadas

5 Figura 9A: se dejó que EBx[®] de pato formaran pequeños grumos en matraces con tanque agitado T175 durante la proliferación celular en un medio SFM de crecimiento celular. Después, los grumos se infectaron con 10-2 TCID50/célula de virus MVA-GFP, y la mezcla se diluyó en medios SFM de producción. Durante un período de propagación del virus de 6 días a 37°C, se tomaron diariamente fotografías de células infectadas expuestas a UV. El pico de la infección por MVA se alcanzó el día 4 pos-infección (pi). El día 6 pi, las células infectadas comenzaron a morir.

15 Figura 9B: titulación del virus MVA-GFP propagado en células EBx[®] de pato en un biorreactor en lotes alimentados de 3 L. (Panel izquierdo) se dejó que la biomasa derivada de EBx de pato se acumulara durante la fase de proliferación celular en medio de crecimiento Excell (SAFC). El día 4, la densidad celular alcanzó 4 millones de células/ml. Después, las células se infectaron con 10-1 TCID50/célula de virus MVA-GFP, y la mezcla se diluyó en 1,5 L de medio Excell. Durante un período de propagación del virus de 6 días a 37°C, las muestras se recogieron diariamente y la titulación de TCID50 (panel derecho) se realizó al término de la cinética. Se alcanzó un rendimiento de 8,5 log de TCID50/ml el 4 p.i. correspondiente a un rendimiento de 205 TCID50/célula.

FIGURA 10: Influencia de la concentración de calcio y magnesio en medio SFM sobre el tamaño de los grumos de células EBx[®]

20 Figura 10A: células EBv13 de pollo se cultivaron primeramente en medio SFM de SAFC Biosciences que comprende una elevada concentración de iones calcio (Ca²⁺) (aprox. 0,79 mM) y magnesio (Mg²⁺); en este medio, las células producen agregados grandes en cultivo.

Tres días después de haber cambiado el medio de cultivo celular por el mismo medio SFM que comprende una concentración menor de Ca²⁺ (0,03 mM final) y Mg²⁺ (1,6 mM final) las células forman agregados más pequeños.

25 Figura 10B: células EB24, EB26 y EB66 de pato se cultivaron primeramente en medio SFM de SAFC Biosciences que comprende una elevada concentración de iones calcio (Ca²⁺) (aprox. 0,79 mM) y magnesio (Mg²⁺); en este medio, las células producen agregados grandes en cultivo.

Tres días después de haber cambiado el medio de cultivo celular por el mismo medio SFM que comprende una concentración menor de Ca²⁺ (0,03 mM final) y Mg²⁺ (1,6 mM final) las células forman agregados más pequeños.

30 FIGURAS 11A y 11B: Producción de cepas A del virus de la influenza en células EBx de pato en biorreactores de 3 L

35 Se dejó que biomasa de EBx[®] de pato se acumulara a 37°C durante la fase de proliferación celular en un medio de crecimiento celular. Las células se infectaron luego con 10-4 de TCID50/célula de virus de la influenza A/H1N1/Beijing/262/95 o A/H3N2/Nueva York/55/2004, la mezcla se diluyó en 1,5 L de medio de producción Excell, suplementado con 0,75 USP/ml de tripsina y la temperatura se redujo a 33°C. Durante un período de propagación del virus de 14 días, se recogieron diariamente muestras y se almacenaron a -80°C.

Figura 11A: cinética de crecimiento de células EBx de pato infectadas con la cepa del virus de la influenza A/H1N1/Beijing/262/95

Panel izquierdo: densidad celular (rombos, x 10⁶ células.ml⁻¹) y título viral en log TCID50/ml

40 Panel derecho: número total de células (cuadrados), viabilidad (círculos en negro, %) y concentración de hemoaglutinina en µg/ml (círculos en rojo, %).

El rendimiento viral alcanzó 20 µg de hemoaglutinina por ml de sobrenadante del cultivo.

Figura 11B: cinética de crecimiento de células EBx de pato infectadas con la cepa del virus de la influenza A/H3N2/Nueva York/55/2004

45 Panel izquierdo: densidad celular (rombos, x 10⁶ células.ml⁻¹)

Panel derecho: número total de células (cuadrados), viabilidad (círculos en negro, %) y concentración de hemoaglutinina en µg/ml (círculos en rojo, %).

El rendimiento viral alcanzó 30 µg de hemoaglutinina por ml de sobrenadante del cultivo.

FIGURA 12: Producción de la cepa B del virus de la influenza en células EBx® de pato

Se dejó que biomasa de EBx® de pato se acumulara a 37°C durante la fase de proliferación celular en un medio de crecimiento celular. Las células se infectaron luego con 10⁻³ de TCID₅₀/célula de virus de la influenza B/Jiangsu/10/2003, la mezcla se diluyó en 1,5 L de medio de producción Excell, suplementado con 0,75 USP/ml de tripsina y la temperatura se redujo a 33°C. Durante un período de propagación del virus de 14 días, se recogieron diariamente muestras y se almacenaron a -80°C.

Panel izquierdo: densidad celular (rombos, x 10⁶ células.ml⁻¹)

Panel derecho: número total de células (cuadrados), viabilidad (círculos en negro, %) y concentración de hemoaglutinina en µg/ml (círculos en rojo, %).

El rendimiento viral alcanzó 25 µg de hemoaglutinina por ml de sobrenadante del cultivo.

FIGURA 13: Análisis de la productividad de NDV y la expresión de proteína viral en células EB66 de pato en suspensión (m.d.i. 10⁻³, 0,75 USP/mL de tripsina)

Células EBx de pato y pollo son sensibles y replican a la cepa La Sota de NDV. Títulos (en TCID₅₀/ml) de NDV producidos en células EB66 de pato aumentan desde el día 0 al día 2 pi, hasta alcanzar una media de 106,83 TCID₅₀/ml (Figura 13, panel izquierdo).

El análisis de transferencia Western (Figura 13, panel derecho) mostró la expresión de proteínas virales de NDV (HN, Fo/F, NP y M). La composición de proteínas virales del virus NDV, producida en células EB66 de pato, es similar a la obtenida con el virus NDV producido en células EB14 de pollo. Además, la cinética de liberación de virus producidos en células EBx de pollo y pato es similar.

FIGURA 14: Análisis de la replicación del virus del sarampión recombinante en células EB66 de pato en suspensión (m.d.i. 10⁻¹ o 10⁻²) en matraces de cultivo de tejidos en medio exento de suero. Células EB66 de pato son al menos tan sensibles como células VERO a la infección por parte del virus del sarampión. Títulos (en TCID₅₀/ml) del virus del sarampión recombinante que expresa la proteína fluorescente verde (GFP) producida en células EB66 de pato alcanzan 107 TCDI₅₀/mL el día 6 pos-infección.

FIGURAS 15A y 15B: SSEA-1, EMA-1 y expresión de telomerasa en células EB66 de pato

La expresión de telomerasa en diferentes pasajes de EB66 de pato cultivadas en frascos rodantes se investigó utilizando el kit de detección de telomerasa de Roche (Telomerase OCR ELISA). SSEA-1 y EMA-1 a diferentes pasajes de EB66 de pato cultivada en frascos rodantes se investigó mediante análisis FACS.

Figura 15A: se encuentra que telomerasa está altamente expresada en la línea de células EB66 de pato en suspensión a diferentes pasajes (138, 144, 147, 150, 154).

Figura 15B: se encontró que los marcadores de las superficies de células SSEA-1 y EMA-1 estaban altamente expresados en la línea de células EB66 de pato en suspensión a diferentes pasajes (138, 144, 147, 150, 154).

FIGURA 16: Análisis del cariotipo de células EB66 de pato

El cariotipo de células EB66 de pato fue realizado por el Dr. Franck, ENVL, Lyon. Células EB66 son células diploides.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Línea de células Fbv13 de pollo procedente de la cepa VALO de pollo SPF

1.1- MATERIAL BRUTO

Huevos

Cepa libre de patógenos específicos (SPF) denominada Valo. La cepa Valo es una raza White Leghorn producida y suministrada por Lohmann de Alemania. Los huevos de pollo SPF, suministrados con un certificado de análisis, se someten a ensayo en cuanto a CAV, adenovirus aviares (grupo 1, serotipos 1-12 y grupo 3), EDS, virus de la encefalomielititis aviar, virus de la leucosis aviar/RSV (incluido el serotipo ALV-J), virus de la nefritis aviar, reovirus aviares, virus de la viruela del gallo, virus de la bronquitis infecciosa, virus de la bursitis infecciosa (IBDV), virus de la laringo-traqueítis infecciosa, virus de la influenza tipo A, virus de la enfermedad de Marek, micoplasmosis (Mg + Ms), Mycobacterium avium, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la reticuloendotelosis, Salmonella

pullorum, otras infecciones por Salmonella, virus de la rinotraqueitis aviar (ATR), Hemophilus paragallinarum. Huevos de pollo Valo fueron solamente sometidos a una desinfección con el descontaminante para evitar cualquier riesgo de contaminación ligada a la manipulación de los huevos durante el transporte.

Células alimentadoras

- 5 En la primera etapa del procedimiento de establecimiento de EBv13, células de origen murino (células STO) se utilizaron como capa alimentadora para mantener la pluripotencia de las células madres de pollo. Estas células alimentadoras son inactivadas mitóticamente mediante irradiación gamma (45 a 55 Grays) antes de ser sembradas sobre plástico. Esta dosis de irradiación es una dosis sub-lethal que induce una paralización definitiva del ciclo celular, pero que sigue permitiendo la producción de factores de crecimiento y matriz extracelular, necesarios para la promoción del crecimiento de la célula de células no diferenciadas.

10 La línea de células STO fue derivada por A. Bernstein, Ontario Cancer Institute, Toronto, Canadá, a partir de una línea continua de fibroblastos embrionarios de ratón SIM (ratones endogámicos de Sandos) y fue suministrada por American Type Culture Collection (ATCC) (número de producto STO: CRL-1503, número de lote 1198713). Capas alimentadoras recientes fueron preparadas dos veces por semana, en general el lunes y el jueves. Las células se disociaron y contaron exponencialmente. Una parte de las células se sembró para el mantenimiento de cultivos viables y otra parte se irradió. Para la irradiación, los autores de la invención prepararon una suspensión de células a razón de 10×10^6 células/mL en tubos. Las células fueron expuestas a una dosis de 45 a 55 Grays y fueron sembradas sobre plástico. Después de la siembra, platos o placas revestidos con células alimentadoras inactivadas fueron utilizados durante un máximo de 5 días.

20 Medio

DMEM- HamF12 (Cambrex, N° de Cat. BE04-687)

Medio Optipro (Invitrogen, N° de Cat. 12309)

EX-CELL™ 65195, 60947 y 65319 (SAFC, medio personalizado)

Aditivos

- 25 Glutamina (Cambrex, N° de Cat. BE17-605E)

Pencilina/estreptomycin (Cambrex, N° de Cat. BE17-602E)

Aminoácidos no esenciales (Cambrex, N° de Cat. BE13-114E)

Piruvato de sodio (Cambrex, N° de Cat. BE13-115)

Vitaminas (Cambrex, N° de Cat. 13-607C)

- 30 Beta-Mercapto-Etanol (Sigma, N° de Cat. M7522)

Tampón y fijadores

PBS 1X (Cambrex, N° de Cat. BE17-516F)

Paraformaldehído al 4 % (Sigma, N° de Cat. P6148)

KCl al 5,6 % (Sigma, N° de Cat. P9333)

- 35 Metanol/Ácido acético (3/1): Metanol (Merck, N° de Cat. K34497209; ácido acético Sigma N° de Cat. A6283)

Colcemid, Karyomax (Gibco, N° de Cat. 15212-046)

Agente crioprotector

Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, N° de Cat. D2650)

Factores

- 40 Se utilizaron dos factores recombinantes diferentes:

- Factor neurotrófico ciliar (CNTF) humano recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 450-13)
- Factor similar a insulina tipo 1 (IGF1) humano recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 100-11)

Los dos factores se produjeron en bacterias E. coli.

Suero bovino fetal

Suero bovino fetal (FBS) no irradiado (JRH, N° de Cat. 12103)

5 El suero no irradiado, utilizado en el programa se recogió y produjo en los Estados Unidos de América. Los animales utilizados para la recolección fueron inspeccionados por el USDA y fueron aceptables para ser sacrificados. El suero se añadió al medio durante el cultivo de células madres aviares. Este lote no se sometió a irradiación para evitar la destrucción de proteínas o componentes críticos identificados como esenciales para el mantenimiento de células madres en cultivo.

Suero irradiado (JRH, N° de Cat. 12107)

10 El lote irradiado utilizado en este programa también se recogió en los Estados Unidos de América. Este lote irradiado se añadió como suplemento al medio DMEM utilizado para el cultivo de células STO o FED (células alimentadoras). Esas células no requieren en calidad de células madres una calidad específica del suero para su crecimiento y mantenimiento en cultivo. Con el fin de minimizar la alta concentración de suero en el medio, los autores de la invención han adaptado las células STO a crecer en presencia de 4% de FBS solamente.

15 Agentes de disociación:

- Pronasa (Roche, N° de Cat. 165 921)

Pronasa es una proteasa recombinante fabricada por Roche Diagnostics, Alemania, utilizada para la disociación de células madres aviares adherentes.

- Tripsina EDTA (Cambrex, N° de Cat. BE17-161E)

20 Tripsina se utiliza para la disociación de células STO o FED y, en pasajes tardíos, para la disociación de células aviares adaptadas a medio exento de suero. Esta enzima de origen porcino se fabrica asépticamente de acuerdo con las condiciones referenciales de cGMP mediante un método de filtración estéril validado y se someten a ensayo de acuerdo con la E.P. actual. El material bruto, irradiado antes de la formulación, se somete a ensayo en cuanto a parvovirus porcino en estricta conformidad con 9/CFR 113.53.

25 • Disolución de disociación de células no enzimáticas (Sigma, N° de Cat. C5914)

Este agente de disociación es una formulación lista para el uso, utilizada para separar suavemente células de la superficie de crecimiento del recipiente de cultivo. La fórmula no contiene proteínas, y permite desplazar células sin el uso de enzimas. Proteínas celulares están conservadas, haciendo posible estudios inmunológicos que dependen del reconocimiento de proteínas de la superficie de la célula. Esta enzima se utilizó para separar las células antes del análisis FACS de marcadores biológicos tales como EMA-1 (antígeno de la membrana epitelial tipo 1) y SSEA1 (antígeno embrionario específico de estado 1).

1.2- PROCESO DE ESTABLECIMIENTO DE LA LÍNEA DE CÉLULAS EBv13

35 Los huevos se abren y la yema se separa de la albúmina durante la apertura. Los embriones se separaron de la yema, ya sea directamente con ayuda de una pipeta Pasteur o con ayuda de un pequeño papel de filtro absorbente (papel Whatmann 3M), previamente cortado en forma de un anillo perforado con ayuda de un troquel. El diámetro de la perforación era de aproximadamente 5 mm. Estos pequeños anillos fueron esterilizados utilizando calor seco durante aproximadamente 30 minutos en una estufa. Este pequeño anillo de papel se deposita sobre la superficie de la yema y se centra sobre el embrión que, de esta forma, queda rodeado por el anillo de papel. Este último se corta luego con ayuda de unas tijeras pequeñas y todo el conjunto separado se coloca en una placa de Petri, llenada con PBS o con una solución salina fisiológica. El embrión, desplazado de esta manera mediante el anillo, fue limpiado del exceso de yema en el medio, y el disco embrionario, exento así de la vitelina en exceso, se recoge con una pipeta Pasteur.

45 Los embriones de pollo Valo se colocaron en un tubo que contenía medio fisiológico (1X PBS, Tris glucosa, medio, y similar). Los embriones Valo fueron luego disociados mecánicamente e inoculados sobre una capa de células STO alimentadoras en medio de cultivo completo a 39°C. Las células alimentadoras fueron sembradas en un matraz a alrededor de $2,7 \times 10^4$ células/cm². El medio de cultivo completo está compuesto de medio comercial basal DMEM-Ham F12 suplementado con suero de ternero fetal al 10%, con IGF1 y CNTF a una concentración final de 1 ng/ml y con 1% de aminoácidos no esenciales, con 1% de una mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a la concentración final de 1 mM, con beta-mercapto-etanol a una concentración final de 0,2 mM, glutamina a una concentración final de 2,9 mM, con una mezcla inicial de antibióticos que contiene penicilina a una

concentración final de 100 U/ml y estreptomycin a una concentración final de 100 µg/ml. Rápidamente después de los primeros pasajes de las células, la mezcla de antibióticos ya no se añade al medio. El término rápidamente se entiende que significa después de los primeros 3 a 5 pasajes en general.

5 Cuando las células ES aviares procedentes de embriones Valo de pollo se hacen pasar de una placa de cultivo a otra, la siembra de las placas de cultivo se realizó con alrededor de entre 7 x 10⁴/cm² y 8 x 10⁴/cm² de células ES aviares en el medio de cultivo completo. Preferiblemente, la siembra se realiza con alrededor de 7,3 x 10⁴/cm² (4 x 10⁶ células/55 cm² o 4 x 10⁶ células/placa de 100 mm). Las células aviares, preferiblemente las células embrionarias aviares de la etapa a) se cultivaron durante varios pasajes en el medio completo. En el pasaje 15, el medio completo se agotó de factores de crecimiento IGF1 y CNTF. El agotamiento se realiza directamente en una etapa, de un pasaje a otro. Las células madre embrionarias, preferiblemente las células embrionarias aviares se cultivan durante varios pasajes en el medio completo sin factores de crecimiento IGF1 y CNTF.

10 Después se realizó el agotamiento de células alimentadoras después del agotamiento de los factores de crecimiento IGF1 y CNTF mediante una disminución progresiva de la concentración de células alimentadoras a lo largo de varios pasajes. En la práctica se utilizó la misma concentración de células alimentadoras para 2 a 4 pasajes, después se utilizó una concentración menor de las células alimentadoras durante 2 a 4 pasajes adicionales, etc. El matraz fue originalmente sembrado con alrededor de 2,7 x 10⁴ células alimentadoras/cm², luego alrededor de 2,2 x 10⁴ células alimentadoras/cm², luego alrededor de 1,8 x 10⁴ células alimentadoras/cm², luego alrededor de 1,4 x 10⁴ células alimentadoras/cm², luego alrededor de 1,1 x 10⁴ células alimentadoras/cm², luego alrededor de 0,9 x 10⁴ células alimentadoras/cm², luego alrededor de 0,5 x 10⁴ células alimentadoras/cm². Después, el matraz fue sembrado con 6,5 x 10⁴ células aviares/cm² a 7,5 x 10⁴ células aviares/cm², y sin células alimentadoras. El agotamiento de células alimentadoras comenzó alrededor del pasaje 21 y terminó alrededor del pasaje 65. Durante el agotamiento de células alimentadoras, las células ES Valo de pollo fueron sembradas en un matraz de cultivo a una concentración menor que en la etapa a), aproximadamente alrededor de 4 x 10⁴ células/cm² a 5 x 10⁴ células/cm². En la hipótesis de que las células ES Valo no tuvieran una buena forma después de una disminución de la concentración de células alimentadoras en el matraz, las células aviares son entonces cultivadas durante pasajes adicionales con la misma concentración de células alimentadoras antes de continuar con el agotamiento de las células alimentadoras.

15 El agotamiento del suero se realizó después del agotamiento del factor de crecimiento y de las células alimentadoras. Al comienzo del agotamiento del suero, el medio de cultivo estaba compuesto por medio DMEM-HamF12 comercial basal, suplementado con suero de ternero fetal al 10% y con 1% de aminoácidos no esenciales, con 1% de una mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 1 mM, con beta-mercapto-etanol a una concentración final de 0,2 mM, glutamina a una concentración final de 2,9 mM. Las células Valo de pollo fueron adaptadas al crecimiento en un cultivo en medio exento de suero en un proceso de dos etapas: primero, las células Valo de pollo fueron rápidamente adaptadas a un medio de cultivo compuesto por medio libre de suero (SFM) comercial, preferiblemente ExCell 60947 (SAFC Biosciences) suplementado con suero de ternero fetal al 10% y con 1% de aminoácidos no esenciales, con 1% de una mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 1 mM, con beta-mercapto-etanol a una concentración final de 0,2 mM, glutamina a una concentración final de 2,9 mM. Una vez que se realizó esta rápida adaptación a un nuevo medio (DMEM-HamF12 a Excell 60947) se realiza una segunda etapa que consiste en iniciar una lenta adaptación a una concentración decreciente del suero animal en el medio SFM. El agotamiento de suero se realizó mediante una disminución progresiva comenzando con 10% de suero, luego 7,5%, luego 5%, luego 2,5%, luego 1,25%, luego 0,75% de concentración de suero en el medio de cultivo de células SFM para alcanzar finalmente el 0% en el medio de cultivo de células SFM. El agotamiento de suero se inició en el pasaje 103 y terminó en el pasaje 135.

20 Al término del proceso de privación de suero, cuando la concentración remanente de suero en el medio SFM era 0,75% o 0%, se inició la adaptación de células EBv13 dependientes de anclaje al cultivo en suspensión. Entre los varios intentos realizados para aislar materiales aislados de EBv13 independientes de anclaje, el 62,5% de los intentos tuvieron éxito y permitieron obtener diferentes materiales aislados de células EBv13 en suspensión. Un material aislado de células EBv13 se seleccionó de acuerdo con el tiempo de duplicación de la población (alrededor de 18 h), la concentración de células óptima en el cultivo en matraz (alrededor de 4 millones de células/ml), la viabilidad de las células, la homogeneidad del cultivo celular (presencia y tamaño de grumos de células) y la facilidad de manipular las células (Figura 1).

25 Al término del agotamiento del suero, células Valo de pollo, dependientes de anclaje, denominadas EBv13, eran capaces de crecer en ausencia de factores de crecimiento, en ausencia de células alimentadoras, en un medio exento de suero. Las células EBv13 fueron luego adaptadas a crecer a 37°C disminuyendo progresivamente la temperatura del cultivo celular de 0,5°C/día.

EJEMPLO 2: Línea celular EB Línea 0 de pollo a partir de la cepa ELL-0 de pollo SPF

2.1- MATERIAL BRUTO

Huevos

5 La cepa libre de patógenos específicos (SPF) de pollo denominada ELL-0 (Línea 0 de East Lansing) fue proporcionada por Avian Disease and Oncology Laboratory (USDA-ARS-MWA, EE.UU.). Los huevos de pollo SPF se producen a partir de una bandada sometida intensamente a ensayo frente a diversos patógenos de aves de corral. Enfermedades sometidas a ensayo incluyen: Salmonella pullorum, Salmonella gallinarum, Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae, virus A-D de la leucosis aviar y el virus de la enfermedad de J, Marek, virus de la reticuloendoteliosis, adenovirus aviar, bronquitis infecciosa, enfermedad bursal infecciosa, influenza aviar, enfermedad de Newcastle, encefalomielititis aviar y reovirus aviar. Los huevos de pollo de Línea 0 fueron solamente sometidos a una desinfección con el descontaminante para evitar cualquier riesgo de contaminación ligada a la manipulación de los huevos durante el transporte de los huevos.

Células alimentadoras

15 En la primera etapa del procedimiento de establecimiento de EB Línea 0, células de origen murino (células STO) se utilizaron como capa alimentadora para mantener la pluripotencia de las células madres de pollo. Estas células alimentadoras son inactivadas mitóticamente mediante irradiación gamma (45 a 55 Grays) antes de ser sembradas sobre plástico. Esta dosis de irradiación es una dosis sub-lethal que induce una paralización definitiva del ciclo celular, pero que sigue permitiendo la producción de factores de crecimiento y matriz extracelular, necesarios para la promoción del crecimiento de la célula de células no diferenciadas.

20 La línea de células STO fue derivada por A. Bernstein, Ontario Cancer Institute, Toronto, Canadá, a partir de una línea continua de fibroblastos embrionarios de ratón SIM (ratones endogámicos de Sandos) y fue suministrada por American Type Culture Collection (ATCC) (número de producto STO: CRL-1503, número de lote 1198713). Capas alimentadoras recientes fueron preparadas dos veces por semana. Las células se disociaron y contaron exponencialmente. Una parte de las células se sembró para el mantenimiento de cultivos viables y otra parte se irradió. Para la irradiación, los autores de la invención prepararon una suspensión de células a razón de 10 x 10⁶ células/mL en tubos. Las células fueron expuestas a una dosis de 45 a 55 Grays y fueron sembradas sobre plástico. Después de la siembra, platos o placas revestidos con células alimentadoras inactivadas fueron utilizados durante un máximo de 5 días.

Medios

30 DMEM- HamF12 (Cambrex, N° de Cat. BE04-687)

Medio GTM-3 (Sigma, N° de Cat. G9916)

Medio EX-CELL™ 66522, 65788 y 66444 (SAFC, medio personalizado)

Aditivos

Glutamina (Cambrex, N° de Cat. BE17-605E)

35 Pencilina/estreptomicina (Cambrex, N° de Cat. BE17-602E)

Aminoácidos no esenciales (Cambrex, N° de Cat. BE13-114E)

Piruvato de sodio (Cambrex, N° de Cat. BE13-115)

Vitaminas (Cambrex, N° de Cat. 13-607C)

Beta-Mercapto-Etanol (Sigma, N° de Cat. M7522)

40 Tampón y fijadores

PBS 1X (Cambrex, N° de Cat. BE17-516F)

Agente crioprotector

Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, N° de Cat. D2650)

Factores

Se utilizaron seis factores recombinantes diferentes:

- Factor neurotrófico ciliar (CNTF) humano recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 450-13)
- Factor similar a insulina tipo 1 (IGF1) humano recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 100-11)
- Interleucina 6 (IL6) humana recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 200-06)
- 5 Receptor de interleucina 6 soluble (sIL6r) humano recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 200-06 R)
- Factor de células madres (SCF) humano recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 300-07)
- Factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) humano recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 100-18B)

10 Todos estos factores, excepto IL6r, se producen en bacterias E. coli. IL6r soluble es expresado en células HEK293 transfectadas.

Suero bovino fetal

Suero bovino fetal (FBS) no irradiado (JRH, N° de Cat. 12003)

15 El suero no irradiado, utilizado en el programa se recogió y produjo en Australia. Los animales utilizados para la recolección fueron inspeccionados por el USDA y fueron aceptables para ser sacrificados. El suero se añadió al medio durante el cultivo de células madres aviares. Este lote no se sometió a irradiación para evitar la destrucción de proteínas o componentes críticos identificados como esenciales para el mantenimiento de células madres en cultivo.

Suero irradiado (JRH, N° de Cat. 12007)

20 El lote irradiado utilizado en este programa se recogió en Australia. Este lote irradiado se añadió como suplemento al medio DMEM utilizado para el cultivo de células STO o FED (células alimentadoras). Esas células no requieren en calidad de células madres una calidad específica del suero para su crecimiento y mantenimiento en cultivo. Con el fin de minimizar la alta concentración de suero en el medio, los autores de la invención han adaptado las células STO a crecer en presencia de 4% de FBS solamente.

Agentes de disociación:

- 25 • Trypzean (Sigma, N° de Cat. T3449)

2.2- PROCESO DE ESTABLECIMIENTO DE LA LÍNEA DE CÉLULAS LÍNEA 0

30 Embriones de 13 huevos de pollo Línea 0 se recolectaron de acuerdo con el proceso descrito en el Ejemplo 1.2. Después, los embriones Línea 0 se colocaron en un tubo que contenía PBS 1X. Los embriones fueron luego disociados mecánicamente e inoculados sobre una capa de células STO alimentadoras en medio de cultivo completo a 39°C. Las células alimentadoras fueron sembradas en placas a alrededor de 2,7 x 10⁴ células/cm². El medio de cultivo completo está compuesto de medio comercial basal DMEM-Ham F12 suplementado con suero de ternero fetal al 10%, con IGF1, CNTF, bFGF, IL6, IL6r y SCF a una concentración final de 1 ng/ml y con 1% de aminoácidos no esenciales, con 1% de una mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 1 mM, con beta-mercapto-etanol a una concentración final de 0,2 mM, glutamina a una concentración final de 2,9 mM, con yeastolate 1X y con una mezcla inicial de antibióticos que contiene penicilina a una concentración final de 100 U/ml y estreptomycin a una concentración final de 100 µg/ml. Después de 7 pasajes, la mezcla de antibióticos ya no se añade al medio.

40 Cuando las células ES aviares procedentes de embriones Línea 0 de pollo se transfieren de una placa de cultivo a otra, la siembra de las placas de cultivo se realizó con alrededor de entre 7 x 10⁴/cm² y 8 x 10⁴/cm² de células ES aviares en el medio de cultivo completo. Preferiblemente, la siembra se realiza con alrededor de 7,3 x 10⁴/cm² (4 x 10⁶ células/55 cm² o 4 x 10⁶ células/placa de 100 mm). Las células aviares, preferiblemente las células embrionarias aviares de la etapa a) se cultivan durante varios pasajes en el medio completo suplementado con 10 ó 15% de FBS. En el pasaje 7, el medio completo se agotó de factores de crecimiento bFGF, IL6, IL6r y SCF. El agotamiento se realizó directamente en una etapa, de un pasaje a otro. Las células madre embrionarias, preferiblemente las células embrionarias aviares se cultivaron durante varios pasajes en el medio completo sin esos 45 4 factores de crecimiento. En el pasaje 12, los dos últimos factores IGF1 y CNTF se separaron del medio y las células se amplificaron sin factor.

Para fomentar el crecimiento de las células se utilizaron tres medios base sucesivamente: DMEM Ham F12 desde el

pasaje 1 hasta el pasaje 18, Excell GTM-3 desde el pasaje 18 al pasaje 26, y una mezcla de Excell 66788 y Excell 66522 después del pasaje 26.

Después del pasaje 30, el agotamiento de células alimentadoras se realizó mediante una disminución progresiva de la concentración de células alimentadoras a lo largo de varios pasajes siguiendo el proceso etapa por etapa, previamente descrito. Durante esta fase de privación de alimentadores, se aislaron algunas células capaces de crecer en suspensión utilizando Excell 66444 como medio de crecimiento y se inició la privación de suero (Figura 1B).

EJEMPLO 3: Línea de células EB66 de EBx de pato

3.1- MATERIAL BRUTO

10 Huevos de pato

Huevos de pato de las razas GL30 de Pekín se obtuvieron de GRIMAUD FRERES SELECTION (La Corbière, Roussay Francia). Los patos parentales se vacunaron contra Escherichia coli (vacuna autógena Coli 01 y 02), Pasteurella multocida (Landavax), hepatitis viral de pato (Hepatovax), Erysipelothrix rhusiopathiae (Ruvax), metapneumovirus aviar (Nemovac), Salmonella typhimurium y Enteridis (vacuna autógena), Riemerella antipestifer (autovacuna Riemerella), metapneumovirus aviar (Nobilis RTV inactivo) y Erysipelothrix rhusiopathiae (Ruvax). Después de su recepción, los huevos de pato de Pekín fertilizados se sometieron a una desinfección en un baño de hipoclorito, seguido de una descontaminación con Fermacidal (Thermo) para evitar cualquier riesgo de contaminación ligado a polvo fijado a la cáscara.

Células alimentadoras

20 En la primera etapa del procedimiento, células de origen murino (células STO) se utilizaron como capa alimentadora para mantener la pluripotencia de las células madres de pollo. Esas células alimentadoras son inactivadas mitóticamente mediante irradiación gamma (45 a 55 Grays) antes de ser sembradas sobre plástico. Esta dosis de irradiación es una dosis sub-letal que induce una paralización definitiva del ciclo celular, pero que sigue permitiendo la producción de factores de crecimiento y matriz extracelular, necesarios para la promoción del crecimiento de la célula de células no diferenciadas. La línea de células STO fue derivada por A. Bernstein, Ontario Cancer Institute, Toronto, Canadá, a partir de una línea continua de fibroblastos embrionarios de ratón SIM (ratones endogámicos de Sandos) y fue suministrada por American Type Culture Collection (ATCC) (número de producto STO: CRL-1503, número de lote 1198713). Capas alimentadoras recientes fueron preparadas dos veces por semana. Las células se disociaron y contaron exponencialmente. Una parte de las células se sembró para el mantenimiento de cultivos viables y otra parte se irradió. Para la irradiación, los autores de la invención prepararon una suspensión de células a razón de 10 x 10⁶ células/mL en tubos. Las células fueron expuestas a una dosis de 45 a 55 Grays y fueron sembradas sobre plástico. Después de la siembra, platos o placas revestidos con células alimentadoras inactivadas fueron utilizados durante un máximo de 5 días.

Medio

35 Medio EX-CELL™ 65788, 65319, 63066 y 66444 (SAFC, medio personalizado)

Medio GTM-3 (Sigma, N° de Cat. G9916)

DMEM-HamF12 (Cambrex, N° de Cat. BE04-687)

DMEM (Cambrex, N° de Cat. BE 12-614F)

Aditivos

40 Glutamina (Cambrex, N° de Cat. BE17-605E)

Pencilina/estreptomicina (Cambrex, N° de Cat. BE17-602E)

Aminoácidos no esenciales (Cambrex, N° de Cat. BE13-114E)

Piruvato de sodio (Cambrex, N° de Cat. BE13-115)

Vitaminas (Cambrex, N° de Cat. 13-607C)

45 Beta-Mercapto-Etanol (Sigma, N° de Cat. M7522)

Yeastolate (SAFC, N° de Cat. 58920C)

Tampón y fijadores

PBS 1X (Cambrex, N° de Cat. BE17-516F)

Agente crioprotector

Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, N° de Cat. D2650)

5 Factores

Se utilizaron dos factores recombinantes diferentes:

- Factor neurotrófico ciliar (CNTF) humano recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 450-13)
- Factor similar a insulina tipo 1 (IGF1) humano recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 100-11)

Esos dos factores se producen en bacterias E. coli.

10 Suero bovino fetal

Suero bovino fetal (FBS) no irradiado (JRH, N° de Cat. 12003)

15 El suero no irradiado, utilizado en el programa se recogió y produjo en Australia. Los animales utilizados para la recolección fueron inspeccionados por el USDA y fueron aceptables para ser sacrificados. El suero se añadió al medio durante el cultivo de células madres aviares. Este lote no se sometió a irradiación para evitar la destrucción de proteínas o componentes críticos identificados como esenciales para el mantenimiento de células madres en cultivo.

Suero irradiado (JRH, N° de Cat. 12107)

20 El lote irradiado utilizado en este programa se recogió en los Estados Unidos de América. Este lote irradiado se añadió como suplemento al medio DMEM utilizado para el cultivo de células STO (células alimentadoras). Esas células no requieren en calidad de células madres una calidad específica del suero para su crecimiento y mantenimiento en cultivo. Con el fin de minimizar la alta concentración de suero en el medio, los autores de la invención han adaptado las células STO a crecer en presencia de 4% de FBS solamente.

Agentes de disociación:

- Pronasa (Roche, N° de Cat. 165 921)

25 Pronasa es una proteasa recombinante fabricada por Roche Diagnostics, Alemania, utilizada para la disociación de células madres aviares adherentes.

- Tripsina EDTA (Cambrex, N° de Cat. BE17-161E)

30 Tripsina se utiliza para la disociación de células STO y, en pasajes tardíos, para la disociación de células aviares adaptadas a medio exento de suero. Esta enzima de origen porcino se fabrica asépticamente de acuerdo con las condiciones referenciales de cGMP mediante un método de filtración estéril validado y se someten a ensayo de acuerdo con la E.P. actual. El material bruto, irradiado antes de la formulación, se somete a ensayo en cuanto a parvovirus porcino en estricta conformidad con 9/CFR 113.53.

- Trypzean (Sigma, N° de Cat. T3449)

35 Disolución Trypzean se formula con una tripsina bovina recombinante, expresada en maíz y fabricada por Sigma Aldrich utilizando el sistema de expresión de proteínas vegetales transgénicas propiedad de ProdiGene. Este producto está optimizado para la disociación celular en cultivos celulares adherentes tanto exentos de suero como suplementados con suero.

- Disolución de disociación de células no enzimáticas (Sigma, N° de Cat. C5914)

40 Este agente de disociación es una formulación lista para el uso, utilizada para separar suavemente células de la superficie de crecimiento del recipiente de cultivo. La fórmula no contiene proteínas, y permite desplazar células sin el uso de enzimas. Proteínas celulares están conservadas, haciendo posible estudios inmunoquímicos que dependen del reconocimiento de proteínas de la superficie de la célula. Esta enzima se utilizó para separar las células antes del análisis FACS de marcadores biológicos tales como EMA-1 (antígeno de la membrana epitelial tipo 1) y SSEA1 (antígeno embrionario específico de estado 1).

3.2- PROCESO DE ESTABLECIMIENTO DE LA LÍNEA DE CÉLULAS EB66 DE EBx DE PATO

Alrededor de 360 huevos de pato fertilizados se abrieron y las yemas se separaron de la albúmina durante la apertura. Los embriones se separaron de la yema con ayuda de un pequeño papel de filtro absorbente (papel Whatmann 3M), previamente cortado en forma de un anillo perforado con ayuda de un troquel. El diámetro de la perforación era de aproximadamente 5 mm. Estos pequeños anillos fueron esterilizados utilizando calor seco durante aproximadamente 30 minutos en una estufa. En la práctica, durante la etapa de recolección del embrión, un pequeño anillo de papel se deposita sobre la superficie de la yema y se centra sobre el embrión que, de esta forma, queda rodeado por el anillo de papel. Este último se corta luego con ayuda de unas tijeras pequeñas y todo el conjunto separado se coloca en una placa de Petri, llenada con PBS. El embrión, desplazado de esta manera mediante el anillo, fue limpiado del exceso de yema en el medio, y el disco embrionario, exento así de la vitelina en exceso, se recogió con una pipeta Pasteur.

Los embriones de pato se colocaron en tubos de 50 mL que contenían PBS 1X. Los embriones de pato fueron luego disociados mecánicamente, lavados con PBS y sembrados sobre una capa inactivada de células STO alimentadoras en medio de cultivo completo a 39°C, 7,5% de CO₂. Las células alimentadoras fueron sembradas en palcas o platos de 6 pocillos a alrededor de 2,7 x 10⁴ células/cm². El medio de cultivo completo está compuesto de medio DMEM-Ham F12 exento de suero y suplementado con suero de bovino fetal al 10%, con IGF1, CNTF a una concentración final de 1 ng/ml y con 1% de aminoácidos no esenciales, con 1% de una mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 0,1 mM, con beta-mercapto-etanol a una concentración final de 0,5 mM, glutamina a una concentración final de 2,1 mM, penicilina a una concentración final de 100 U/ml, estreptomycin a una concentración final de 100 µg/ml y yeastolate 1X. Rápidamente, en el pasaje 4, la mezcla de antibióticos ya no se añade al medio.

Los embriones de pato se dispusieron en tubos de 50 mL que contenía PBS 1X. Los embriones de pato fueron luego mecánicamente disociados, lavados con PBS y sembrados sobre una capa inactivada de células STO alimentadoras en medio de cultivo completo a 39°C, 7,5% de CO₂. Las células alimentadoras fueron sembradas en placas o platos de 6 pocillos a alrededor de 2,7 x 10⁴ células/cm². El medio de cultivo completo está constituido por medio libre de suero DMEM-Ham F12 suplementado con suero de ternero fetal al 10%, con IGF1 y CNTF a una concentración final de 1 ng/ml y con 1% de aminoácidos no esenciales, con 1% de una mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a la concentración final de 0,1 mM, con beta-mercapto-etanol a una concentración final de 0,5 mM, glutamina a una concentración final de 2,1 mM, penicilina a una concentración final de 100 U/ml, estreptomycin a una concentración final de 100 µg/ml y yeastolate 1X. Rápidamente en el pasaje 4, la mezcla de antibióticos ya no se añade al medio.

Las células ES de pato se cultivaron en el medio DMEM-Ham F12 hasta el pasaje 4. Después del pasaje 4, el medio base se modifica y el medio completo de DMEM-Ham F12 se reemplaza por el medio SFM GTM-3, suplementado con suero de bovino fetal al 10%, con IGF1 y CNTF a una concentración final de 1 ng/ml, con 1% de aminoácidos no esenciales, con 1% de una mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 0,1 mM, con beta-mercapto-etanol a una concentración final de 0,5 mM, glutamina a una concentración final de 2,1 mM, y yeastolate 1X. Las células ES de pato se cultivaron adicionalmente durante 14 pasajes en este nuevo medio de cultivo, después se realizó la privación de factores de crecimiento en el pasaje 18. IGF1 y CNTF se separaron simultáneamente del medio, por lo tanto del pasaje 19 al pasaje 24 el medio de cultivo era medio GTM-3 suplementado con FBS al 10%, con 1% de aminoácidos no esenciales, con 1% de una mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 0,1 mM, con beta-mercapto-etanol a una concentración final de 0,5 mM, glutamina a una concentración final de 2,1 mM y yeastolate 1X.

Cuando las células ES de pato procedentes de embriones de pato de Pekín se hicieron pasar de una placa de cultivo a otra, la siembra de la placa de cultivo se realizó con alrededor de entre 7 x 10⁴ /cm² y 12 x 10⁴ /cm² de células ES de pato en el medio de cultivo completo.

Luego, después del pasaje 24, se realizó el agotamiento de células alimentadoras mediante una disminución progresiva de la concentración de células alimentadoras a lo largo de varios pasajes. Las placas fueron originalmente sembradas con alrededor de 2,7 x 10⁴ células alimentadoras/cm², luego alrededor de 1,8 x 10⁴ células alimentadoras/cm² entre el pasaje 25 y 31, luego alrededor de 1,4 x 10⁴ células /cm² entre el pasaje 32 y 35, luego alrededor de 1 x 10⁴ células alimentadoras/cm² entre el pasaje 36 y 41, luego alrededor de 0,7 x 10⁴ células alimentadoras/cm² entre el pasaje 42 y 44 y, finalmente, a partir del pasaje 45, las placas se sembraron solamente con células aviares y sin células alimentadoras. Al final del agotamiento de los alimentadores, las placas se sembraron con 9 x 10⁴ células aviares/cm² hasta 12,7 x 10⁴ células aviares/cm². El agotamiento de células alimentadoras comenzó en el pasaje 25 y terminó en el pasaje 45. Durante el agotamiento de células alimentadoras, las células ES de pato se siembran en placas de cultivo a una concentración mayor que en la etapa a), aproximadamente alrededor de 9 x 10⁴ células/cm² a 12,7 x 10⁴ células/cm².

Después de varios pasajes sin células alimentadoras se estudian los parámetros de crecimiento (tiempo de duplicación de la población, (PDT) y densidad) para confirmar la estabilidad y robustez de las células y para iniciar la privación de aminoácidos, vitaminas, beta-mercapto-etanol, piruvato de sodio y yeastolate. Las células se consideran lo suficientemente robustas como para ser sometidas a una privación de este tipo y si el PDT es menor que alrededor de 40 horas y la densidad celular es mayor que 26×10^4 células/cm².

En el caso del presente desarrollo de células EBx® de pato, denominadas EB66, la privación de vitaminas, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales y beta-mercapto-etanol se inició en el pasaje 52. Todos esos aditivos fueron separados simultáneamente del medio. Así, entre el pasaje 52 y el pasaje 59, el medio de cultivo es SFM GTM-3 suplementado con glutamina, yeastolate y FBS. Después de un corto período de adaptación a las nuevas condiciones de cultivo, se inició el descenso de la temperatura. Este descenso se realizó progresivamente entre el pasaje 60 y el pasaje 67. Después del pasaje 67, las células eran capaces de crecer a 37°C. Después del pasaje 67, el medio base GTM-3 fue reemplazado por un nuevo medio base SFM denominado Excell 65788. Así, después del pasaje 67, el medio de cultivo era Excell 65788 suplementado con FBS al 10%, glutamina 2,5 mM y 1X yeastolate. En el pasaje 80, 4×10^6 células fueron transferidas a una placa de fijación Ultra Low (ULA) bajo agitación constante para iniciar el crecimiento de las células independiente de anclaje. Para fomentar el crecimiento como suspensión, el medio base se modificó y el porcentaje de suero fue reducido de 10% a 5% para la siembra en la placa ULA. Así, desde el pasaje 80 al pasaje 85 el medio de cultivo era SFM GTM-3 suplementado con FBS al 5%, glutamina 2,5 mM y 1X yeastolate. Se inició una disminución lenta de FBS en la suspensión de células EB66 después del pasaje 85. El agotamiento de suero se realizó mediante una disminución progresiva comenzando desde 2,5% de suero, luego 1,5% de concentración de suero en medio de cultivo de células SFM hasta finalmente alcanzar 0% de suero en el medio de cultivo de células SFM. El agotamiento de suero se inició en el pasaje 86 y terminó en el pasaje 94. Al término del agotamiento de suero, células dEB66 independientes de anclaje eran capaces de crecer a 37°C en ausencia de factores de crecimiento, en ausencia de células alimentadoras, en medio exento de suero.

Después de obtener las células de pato EB66 que eran capaces de crecer a 37°C en el SFM GTM-3 suplementado con glutamina 2,5 mM, se realizó alguna adaptación adicional a medios SFM mediante dilución o adaptación progresiva en nuevas formulaciones de SFM tales como Excell 63066, Excell 66444, Excel CHO ACF, por ejemplo.

La subclonación de las células EB66 de pato en suspensión podía también realizarse en presencia o ausencia de yeastolate.

30 EJEMPLO 4: Línea de células EB26 de EBx de pato

4.1- MATERIAL BRUTO

Huevos de pato, Células alimentadoras, Aditivos, Tampones y fijadores, Agentes crioconservantes, Suero de ternero fetal y agentes disociantes (igual que en el Ejemplo 3).

Se utilizaron huevos de pato de la raza GL30 de Pekín.

35 Medio

Medio EX-CELL™ 65319, 63066 y 66444 (SAFC, medio personalizado)

Medio GTM-3 (Sigma, N° de Cat. G9916)

DMEM (Cambrex, N° de Cat. BE 12-614F)

Factores

40 Se utilizaron seis factores recombinantes diferentes:

- Factor neurotrófico ciliar (CNTF) humano recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 450-13)
- Factor similar a insulina tipo 1 (IGF1) humano recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 100-11)
- Interleucina 6 (IL6) humana recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 200-06)
- Receptor de interleucina 6 soluble (sIL6r) humano recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 200-06 R)

45 Factor de células madres (SCF) humano recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 300-07)

- Factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) humano recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 100-18B)

Todos estos factores, excepto IL6r, se producen en bacterias E. coli. IL6r soluble es expresado en células HEK293 transfectadas.

4.2- PROCESO DE ESTABLECIMIENTO DE LA LÍNEA DE CÉLULAS EB26 DE EBx DE PATO

Los embriones de pato de recolectaron tal como se ha descrito previamente con EB66. Los embriones de pato se dispusieron en tubos de 50 mL que contenían PBS 1X. Los embriones de pato fueron luego mecánicamente disociados, lavados con PBS y sembrados sobre una capa inactivada de células STO alimentadoras en medio de cultivo completo a 39°C, 7,5% de CO₂. Las células alimentadoras fueron sembradas en placas o platos de 6 pocillos a alrededor de 2,7 x 10⁴ células/cm². El medio de cultivo completo está constituido por medio libre de suero GTM-3 suplementado con suero de bovino fetal al 5%, con IGF1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF y FGF a una concentración final de 1 ng/ml y con 1% de aminoácidos no esenciales, con 1% de una mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 0,1 mM, con beta-mercapto-etanol a una concentración final de 0,5 mM, glutamina a una concentración final de 2,1 mM, penicilina a una concentración final de 100 U/ml, estreptomina a una concentración final de 100 µg/ml y yeastolate 1X. Rápidamente, después de los primeros pasajes de las células, la mezcla de antibióticos ya no se añade al medio. El término rápidamente se entiende que significa después de los primeros 3 a 9 pasajes en general. Las células ES de pato se cultivaron en el medio completo hasta el pasaje 9. Después del pasaje 9, el medio completo se agota parcialmente de factores. Así, entre el pasaje 10 y el 13, SCF, IL6, IL6r y bFGF se separaron del medio y sólo se mantuvieron IGF1 recombinante y CNTF a una concentración de 1 ng/ml. En segundo lugar, se realiza una disminución simultánea de la concentración de IGF1 y CNTF entre el pasaje 13 y el 16 para obtener finalmente células capaces de crecer sin factores recombinantes en el pasaje 17. El agotamiento de factores se realizó mediante una adaptación progresiva a concentraciones menores de factores. Cuando las células ES de pato procedentes de embriones de pato de Pekín se hicieron pasar de una placa de cultivo a otra, la siembra de la placa de cultivo se realizó con alrededor de 7 x 10⁴ /cm² a 12 x 10⁴ /cm² de células ES de pato en el medio de cultivo completo. Preferiblemente, la siembra se realiza con alrededor de 7,3 x 10⁴/cm² (4 x 10⁶ células/55 cm² o 4 x 10⁶ células/placa de 100 mm). Después del agotamiento de factores recombinantes, se realizó una disminución de yeastolate en el pasaje 23 alcanzando la concentración final a 0,5X. Luego, después del pasaje 31, el agotamiento de células alimentadoras se realizó mediante una disminución progresiva de la concentración de células alimentadoras a lo largo de varios pasajes. Las placas se sembraron originalmente con alrededor de 2,7 x 10⁴ células alimentadoras/cm², luego alrededor de 1,8 x 10⁴ células alimentadoras/cm² entre el pasaje 32 y 38, luego alrededor de 1,4 x 10⁴ células/cm² entre el pasaje 39 y 44, luego alrededor de 1 x 10⁴ células alimentadoras/cm² entre el pasaje 45 y 47, luego alrededor de 0,7 x 10⁴ células alimentadoras/cm² entre el pasaje 48 y 50 y, finalmente, a partir del pasaje 51, las placas se sembraron solamente con células aviares y sin células alimentadoras. Al final del agotamiento de los alimentadores, las placas se sembraron con 9 x 10⁴ células aviares/cm² a 12,7 x 10⁴ células aviares/cm². El agotamiento de células alimentadoras comenzó en el pasaje 32 y finalizó en el pasaje 51. Durante el agotamiento de células alimentadoras, las células ES de pato se siembran en placas de cultivo a una concentración mayor que en la etapa a), aproximadamente alrededor de 9 x 10⁴ células/cm² a 12,7 x 10⁴ células/cm². Después de varios pasajes sin células alimentadoras, se estudian los parámetros de crecimiento (tiempo de duplicación de la población, (PDT) y densidad) para confirmar la estabilidad y robustez de las células y para iniciar el crecimiento de las células en forma de suspensión. Las células se consideran lo suficientemente robustas como para ser sometidas a un cultivo en suspensión si el PDT es menor que alrededor de 40 horas y la densidad celular es mayor que 26 x 10⁴ células/cm². Además de ello, la morfología de las células debería ser: redonda, refringente, muy pequeñas y las células no deben fijarse demasiado al plato de plástico.

En el caso del desarrollo de células EB26, el cultivo en suspensión se inició en el pasaje 53. 7 x 10⁶ células se transfirieron a una placa de fijación Ultra Low y se mantuvieron bajo agitación constante a alrededor de 50 a 70 rpm. Para los siguientes pasajes, las células se sembraron en matraces T175 (Sarsted, ref 831812502) a una concentración comprendida entre 0,4 y 0,5 x 10⁶ células/mL. Después de un corto período de adaptación a las nuevas condiciones de cultivo, el PDT de las células disminuyó desde alrededor de 160 h hasta 40 horas. En relación con esta buena evolución, en el pasaje 59 se realizó un nuevo conjunto de privaciones. Así, se separaron vitaminas, piruvato de sodio, beta-mercapto-etanol y aminoácidos no esenciales. Por lo tanto, después del pasaje 59, el medio de cultivo se suplementó con FBS al 5%, 0,5X yeastolate y glutamina 2,5 mM solamente. El agotamiento del suero se realiza en suspensiones de células ya agotadas en factor de crecimiento, células alimentadoras, vitaminas, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y beta-mercapto-etanol. El agotamiento del suero se realizó mediante una disminución progresiva partiendo de 5% de suero, luego 2,5%, luego 1,5% de concentración de suero en medio de cultivo de células SFM hasta alcanzar finalmente 0% de suero en medio de cultivo de células SFM. El agotamiento del suero se inició en el pasaje 61 y terminó en el pasaje 79. Al término del agotamiento del suero, células EB26 de pato independientes de anclaje fueron capaces de crecer a 39°C, en ausencia de factores de crecimiento, en ausencia de células alimentadoras, en medio exento de suero. Después, las células EB26 se adaptaron al crecimiento en ausencia de 0,5X yeastolate a 37°C disminuyendo la temperatura del cultivo celular en el pasaje 80.

Después de obtener las células EB26 que son capaces de crecer a 37°C en el SFM GTM-3 suplementado con glutamina 2,5 mM, se realizaron algunas adaptaciones adicionales mediante dilución o adaptación progresiva en nuevas formulaciones de SFM tales como Excell 63066, Excell 66444, Excel CHO ACF. La subclonación de las células EB66 de pato en suspensión podía también realizarse en presencia o ausencia de yeastolate.

5 EJEMPLO 5: Línea de células EB24 de EBx de pato

5.1- MATERIAL BRUTO

Huevos de pato, Células alimentadoras, Aditivos, Tampones y fijadores, Agentes crioconservantes, Suero de ternero fetal y agentes disociantes (igual que en el Ejemplo 3).

Se utilizaron huevos de pato de la raza GL30 de Pekín.

10 Medio

Medio EX-CELL™ 65319, 63066 y 66444 (SAFC, medio personalizado)

Medio GTM-3 (Sigma, N° de Cat. G9916)

DMEM F12 (Cambrex, N° de Cat. BE04-687)

DMEM (Cambrex, N° de Cat. BE 12-614F)

15 Factores

Se utilizaron seis factores recombinantes diferentes:

Factor neurotrófico ciliar (CNTF) humano recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 450-13)

Factor similar a insulina tipo 1 (IGF1) humano recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 100-11)

Interleucina 6 (IL6) humana recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 200-06)

20 Receptor de interleucina 6 soluble (sIL6r) humano recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 200-06 R)

Factor de células madres (SCF) humano recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 300-07)

Factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) humano recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 100-18B)

25 Todos estos factores, excepto IL6r, se producen en bacterias E. coli. IL6r soluble es expresado en células HEK293 transfectadas.

5.2- PROCESO DE ESTABLECIMIENTO DE LA LÍNEA DE CÉLULAS EB24 DE EBx DE PATO

30 Los embriones de pato de recolectaron tal como se ha descrito previamente con EB66. Los embriones de pato se dispusieron en tubos de 50 mL que contenían PBS 1X. Los embriones de pato son luego mecánicamente disociados y sembrados sobre una capa inactivada de células STO alimentadoras en medio de cultivo completo a 39°C, 7,5% de CO₂. Las células alimentadoras fueron sembradas en placas o platos de 6 pocillos a alrededor de 2,7 x 10⁴ células/cm². El medio de cultivo completo está compuesto por medio libre de suero DMEM-Ham F12 suplementado con suero de bovino fetal al 10%, con IGF1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF y FGF a una concentración final de 1 ng/ml y con 1% de aminoácidos no esenciales, con 1% de una mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 0,1 mM, con beta-mercapto-etanol a una concentración final de 0,5 mM, glutamina a una concentración final de 2,1 mM, penicilina a una concentración final de 100 U/ml, estreptomycin a una concentración final de 100 µg/ml y 1X yeastolate. Rápidamente, después de los primeros pasajes de las células, la mezcla de antibióticos ya no se añade al medio. El término rápidamente se entiende que significa después de los primeros 3 a 9 pasajes en general.

40 Las células ES de pato se cultivan en el medio completo DMEM-Ham F12 hasta el pasaje 7. Después del pasaje 7, se modifica el medio base y medio completo DMEM-Ham F12 se reemplaza por medio completo GTM-3 suplementado con suero de bovino fetal al 10%, con IGF1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF y FGF a una concentración final de 1 ng/ml, con 1% de aminoácidos no esenciales, con 1% de una mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 0,1 mM, con beta-mercapto-etanol a una concentración final de 0,5 mM, glutamina a una concentración final de 2,1 mM, penicilina a una concentración final de 100 U/ml, estreptomycin a una concentración final de 100 µg/ml y yeastolate 1X. Así, en el pasaje 11, la concentración de suero se disminuye a 5% y SCF, IL6, IL6r y bFGF se separan del medio. De esta forma, desde el pasaje 11, el

medio está compuesto por FBS al 5%, con IGF1 y CNTF a una concentración final de 1 ng/ml, con 1% de aminoácidos no esenciales, con 1% de una mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 0,1 mM, con beta-mercapto-etanol a una concentración final de 0,5 mM, glutamina a una concentración final de 2,1 mM, penicilina a una concentración final de 100 U/ml, estreptomycin a una concentración final de 100 µg/ml y yeastolate 1X. Se realiza una retirada simultánea de IGF1 y CNTF en el pasaje 22. Después del pasaje 22, en el medio de cultivo GTM-3 no están presentes factores recombinantes. Células de pato se mantuvieron en un medio de este tipo entre el pasaje 23 y el pasaje 28. Cuando las células ES de pato procedentes de embriones de pato de Pekín se hicieron pasar de una placa de cultivo a otra, la siembra de la placa de cultivo se realizó con alrededor de 7×10^4 /cm² a 12×10^4 /cm² de células ES de pato en el medio de cultivo completo. Preferiblemente, la siembra se realiza con alrededor de $7,3 \times 10^4$ /cm² (4×10^6 células/55 cm² o 4×10^6 células/placa de 100 mm). Luego, después del pasaje 28, el agotamiento de factores recombinantes se realiza mediante una disminución progresiva de la concentración de células alimentadoras a lo largo de varios pasajes. Las placas se sembraron originalmente con alrededor de $2,7 \times 10^4$ células alimentadoras/cm², luego alrededor de $1,8 \times 10^4$ células alimentadoras/cm² entre el pasaje 29 y 33, luego alrededor de $1,4 \times 10^4$ células/cm² entre el pasaje 34 y 37, luego alrededor de 1×10^4 células alimentadoras/cm² entre el pasaje 38 y 42, luego alrededor de $0,7 \times 10^4$ células alimentadoras/cm² entre el pasaje 43 y 46 y, finalmente, a partir del pasaje 47, las placas se sembraron solamente con células aviares y sin células alimentadoras. Al final del agotamiento de los alimentadores, las placas se siembran con 9×10^4 células aviares/cm² a $12,7 \times 10^4$ células aviares/cm². El agotamiento de células alimentadoras comenzó en el pasaje 29 y finalizó en el pasaje 47. Durante el agotamiento de células alimentadoras, las células ES de pato se siembran en placas de cultivo a una concentración mayor que en la etapa a), aproximadamente alrededor de 9×10^4 células/cm² a $12,7 \times 10^4$ células/cm². Después de varios pasajes sin células alimentadoras, se estudian los parámetros de crecimiento (tiempo de duplicación de la población (PDT) y densidad) para confirmar la estabilidad y robustez de las células y para iniciar el crecimiento de las células en forma de suspensión. Las células se consideran lo suficientemente robustas como para ser sometidas a un cultivo en suspensión si el PDT es menor que alrededor de 40 horas y la densidad celular es mayor que 26×10^4 células/cm². Además de ello, la morfología de las células debería ser: redonda, refringente, muy pequeñas y las células no deben fijarse demasiado al plato de plástico. En el caso del desarrollo de células EB24, el cultivo en suspensión se inició en el pasaje 48. 8×10^6 células se transfirieron a una placa de fijación Ultra Low y se mantuvieron bajo agitación constante a alrededor de 50 a 70 rpm. Para los siguientes pasajes, las células se sembraron en matraces T175 (Sarsted, ref 831812502) a una concentración comprendida entre $0,4$ y $0,5 \times 10^6$ células/mL. Después de un corto período de adaptación a las nuevas condiciones de cultivo, el PDT de las células disminuyó desde alrededor de 248 h hasta 128 horas y luego se realiza la siguiente etapa de privación. Así, en el pasaje 52, se separan vitaminas, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y beta-mercapto-etanol. En relación con la buena evolución del PDT que alcanza 44 horas en el pasaje 56, desde el pasaje 57 se inició la privación de suero. Así, desde el pasaje 57, el medio de cultivo GTM-3 se suplementó con FBS al 5%, 1X yeastolate y glutamina 2,5 mM solamente. El agotamiento del suero se realiza en suspensiones de células ya agotadas en factores de crecimiento, células alimentadoras, vitaminas, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y beta-mercapto-etanol. El agotamiento del suero se realizó mediante una disminución progresiva partiendo de 5% de suero, luego 2,5%, luego 1,5% de concentración de suero en medio de cultivo de células SFM hasta alcanzar finalmente 0% de suero en medio de cultivo de células SFM. El agotamiento del suero se inició en el pasaje 57 y terminó en el pasaje 77. Durante este agotamiento del suero, también se realizó la adaptación al crecimiento a 37°C. Así, en el pasaje 65, células que crecen en el medio de cultivo suplementado con FBS al 2,5% se transfirieron a 37°C, evitando un desplazamiento progresivo de la temperatura. Al término del agotamiento del suero, células EB24 de pato independientes de anclaje fueron capaces de crecer a 37°C, en ausencia de factores de crecimiento, en ausencia de células alimentadoras, en medio exento de suero.

Después de obtener las células EB24 que son capaces de crecer a 37°C en el SFM GTM-3 suplementado con glutamina 2,5 mM, se realizaron algunas adaptaciones adicionales mediante dilución o adaptación progresiva en nuevas formulaciones de SFM tales como Excell 63066, Excell 66444, Excel CHO ACF. Se realizó la subclonación de las células EB24 de pato, se seleccionó un subclon EB24-12 de pato debido a su buen comportamiento para replicar eficazmente virus.

EJEMPLO 6: Línea celular EBx de pato de Muscovy SPF

6.1- MATERIAL BRUTO

Huevos de Pato:

Huevos SPF de pato de razas de Muscovy se obtuvieron de Le Couvoir de Cerveloup (Francia). Esos huevos de pato SPF se producen a partir de una bandada sometida intensamente a ensayo frente a diversos patógenos de aves de corral. Enfermedades sometidas a ensayo incluyen: Salmonella gallinarum-pullorum, Mycoplasma synoviae, Mycoplasma maleagris, Mycoplasma gallisepticum, virus de la enfermedad de Marek, influenza aviar, Paramyxovirus de Tipo 2, Paramyxovirus de Tipo 3, enfermedad de Newcastle, adenovirus de Tipo 3 (EDS),

enfermedad de Gumboro, reovirus aviar, virus de la reticuloendoteliosis, encefalomiелitis aviar, virus de la rinotraqueitis infecciosa y clamidiosis. Los huevos de pato de Muscovy fueron solamente sometidos a una desinfección con el descontaminante para evitar cualquier riesgo de contaminación ligada a la manipulación de los huevos durante el transporte.

5 Células alimentadoras (véanse los Ejemplos previos)

Medios

Medio EX-CELL™ 66444 (SAFC, medio personalizado)

Medio GTM-3 (Sigma, N° de Cat. G9916)

DMEM- HamF12 (Cambrex, N° de Cat. BE04-687)

10 Aditivos

Glutamina (Cambrex, N° de Cat. BE17-605E)

Pencilina/estreptomycin (Cambrex, N° de Cat. BE17-602E)

Aminoácidos no esenciales (Cambrex, N° de Cat. BE13-114E)

Piruvato de sodio (Cambrex, N° de Cat. BE13-115)

15 Vitaminas (Cambrex, N° de Cat. 13-607C)

Beta-Mercapto-Etanol (Sigma, N° de Cat. M7522)

Yeastolate (SAFC, N° de Cat. 58902C)

Tampón y fijadores:

PBS 1X (Cambrex, N° de Cat. BE17-516F)

20 Agente crioprotector

Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, N° de Cat. D2650)

Factores

Se utilizaron dos factores recombinantes diferentes:

Factor neurotrófico ciliar (CNTF) humano recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 450-13)

25 Factor similar a insulina tipo 1 (IGF1) humano recombinante (Peprotech Inc, N° de Cat. 100-11)

Esos dos factores se producen en bacterias E. coli.

Suero bovino fetal

Suero bovino fetal (FBS) no irradiado (JRH, N° de Cat. 12003)

30 El suero no irradiado, utilizado en el programa se recogió y produjo en Australia. Los animales utilizados para la recolección fueron inspeccionados por el USDA y fueron aceptables para ser sacrificados. El suero se añadió al medio durante el cultivo de células madres aviares. Este lote no se sometió a irradiación para evitar la destrucción de proteínas o componentes críticos identificados como esenciales para el mantenimiento de células madres en cultivo.

Suero irradiado (JRH, N° de Cat. 12007)

35 El lote irradiado utilizado en este programa se recogió en Australia. Este lote irradiado se añadió como suplemento al medio DMEM utilizado para el cultivo de células STO (células alimentadoras). Esas células no requieren en calidad de células madres una calidad específica del suero para su crecimiento y mantenimiento en cultivo. Con el fin de minimizar la alta concentración de suero en el medio, los autores de la invención han adaptado las células STO a crecer en presencia de 4% de FBS solamente.

40 Agentes de disociación:

- Pronasa (Roche, N° de Cat. 165 921)
- Trypzean (Sigma, N° de Cat. T3449)

6.2- PROCESO DE ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS DE CÉLULAS EBx DE PATO MUSCOVY

Embriones procedentes de 20 huevos SPF fertilizados de patos Muscovy se recolectaron de acuerdo con el proceso descrito en el Ejemplo 3. Los embriones de pato se colocaron en tubos de 50 mL que contenían PBS 1X. Después, los embriones de pato se disociaron mecánicamente, se lavaron con PBS y se sembraron en un pocillo de una placa de 12 pocillos revestida con una capa inactivada de células STO alimentadoras. Las células embrionarias de pato se sembraron en medio de cultivo completo y se transfirieron a 39°C, 7,5% 5% de CO₂. Las células alimentadoras se sembraron a alrededor de 2,7 x 10⁴ células/cm². El medio de cultivo completo utilizado está compuesto por DMEM-Ham F12 suplementado con suero de bovino fetal al 10%, con IGF1, CNTF a una concentración final de 1 ng/ml y con 1% de aminoácidos no esenciales, con 1% de una mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 0,1 mM, con beta-mercapto-etanol a una concentración final de 0,5 mM, glutamina a una concentración final de 2,1 mM, penicilina a una concentración final de 100 U/ml, estreptomina a una concentración final de 100 µg/ml y yeastolate 1X. En el pasaje 2, el medio base DMEM-HamF12 es reemplazado por medio base GTM-3. Después del pasaje 4, ya no se añade al medio la mezcla de antibióticos.

Las células ES de pato se cultivaron en el medio GTM-3 completo hasta el pasaje 8. Después del pasaje 8, la concentración de IGF1 y CNTF se reduce a 0,5 ng/ml. Las células ES de pato se cultivaron adicionalmente durante 2 pasajes en este nuevo medio de cultivo y luego se realizó una privación de factores de crecimiento en el pasaje 10. IGF1 y CNTF se separaron simultáneamente del medio.

Así, desde el pasaje 10 al pasaje 37, el medio de cultivo era medio GTM-3 suplementado con FBS al 10%, con 1% de aminoácidos no esenciales, con 1% de una mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 0,1 mM, con beta-mercapto-etanol a una concentración final de 0,5 mM, glutamina a una concentración final de 2,1 mM, y yeastolate 1X.

Cuando las células ES de pato aisladas de embriones de pato de Muscovy se hacen pasar de una placa de cultivo a otra, la siembra se realizó con alrededor de 12 x 10⁴/cm² de células ES de pato en el medio de cultivo. Ocasionalmente, se puede utilizar algo de medio acondicionado para la siembra de células para mejorar la recuperación de células pos-disociación.

Luego, después del pasaje 37, el agotamiento de células alimentadoras se realizó mediante una disminución progresiva de la concentración de células alimentadoras a lo largo de varios pasajes siguiendo el proceso etapa por etapa, previamente descrito.

Durante esta fase de privación de alimentadores, se aislaron algunas células capaces de crecer en suspensión y se adaptaron a crecer sin aditivos y suero (Figura 4C). Células EBx de pato de Muscovy independientes de anclaje, expresan marcadores de células ES tales como telomerasa, SSEA-1 y EMEA-1 (datos no mostrados).

35 EJEMPLO 7: Caracterización de líneas de células EBx

7.1.- CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS EBv13 VALO DE POLLO

7.1.1. – Actividad de telomerasa

La detección de telomerasa se consigue utilizando el ELISA PCR telomerasa Telo TAGGG desarrollado por Roche Applied Science (Protocolo de Amplificación Repetitivo Telomérico (TRAP) – N° de Cat. 11 854 666 910) de acuerdo con el protocolo del suministrador. El ELISA PCR telomerasa Telo TAGGG permite la amplificación de productos de alargamiento mediada por telomerasa, combinados con detección no radiactiva siguiendo un protocolo ELISA. El ensayo es válido si el valor de absorbancia del control negativo es menor que o igual a 0,25 A450 nm - A690 nm, y si el valor de absorbancia del control positivo es mayor que o igual a 1,5 A450 nm - A690 nm, cuando se utilizan 1 x 10³ equivalentes de células en el ensayo. Las muestras se consideran telomerasa positivas, si la diferencia en la absorbancia es mayor que 0,2 unidades A450 nm - A690 nm. Se utilizaron dos controles: el control negativo es fibroblastos murinos (células FED) y los controles positivos son células FGB8 (células madre embrionarias establecidas por Vivalis a partir de 129 embriones de ratones SV) y células EB14-O74 de pollo previamente establecidas en el documento WO 03/076601.

Los resultados obtenidos se resumen en la Figura N° 2. Células EBv13 expresan un alto nivel de telomerasa. En los pasajes p193 y 195 la actividad de telomerasa es equivalente a la de células EB14-O74 de pollo.

7.1.2- Marcadores biológicos de células ES

Células madres embrionarias se caracterizan por la expresión de marcadores biológicos expresados en la membrana celular. La expresión de EMA-1 (antígeno de la membrana epitelial 1) y SSEA-1 (antígeno embrionario específico de estado 1) en células EBv13 se evaluaron mediante análisis FACS. Al cabo de 10 minutos de fijación con PFA (para-formaldehído) al 4%, muestras de células y controles se aclaran y pre-incuban con anticuerpos monoclonales específicos de EMA-1 o SSEA-1. Se utiliza un segundo anticuerpo conjugado a FITC para la detección de células que expresan los 2 marcadores biológicos seleccionados. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un FACS (clasificador de células activadas por fluorescencia) de Coulter.

El análisis por FACS se realizó en células de fibroblastos de ratón (células FED) como un control negativo, células FGB8 ES murinas como un control positivo, células EB14-O74 de pollo como un control positivo, células EBx y células EBv13. Como era de esperar, las células FED no expresan marcadores biológicos, mientras que células FGB8 y EB14-O74 presentan una tinción importante, respectivamente de 60,13% y 78,7 para EMA-1 y 94,45% y 95% para SSEA-1 (datos no mostrados). La población de células EBv13 de pollo no presenta tinción alguna para EMA1 (2%) y una muy ligera para SSEA-1 (22%).

7.1.3.- Cariotipo

El análisis del cariotipo se realizó para verificar la diploidad de células y el origen aviar de células EBv13. Células en la fase exponencial de crecimiento se recolectaron y trataron durante 2 horas mediante colcemida (0,02 µg/mL). Después del lavado y de la centrifugación se realiza un choque hipotónico en células con KCl (0,56%) durante 20 minutos. Subsiguientemente, las células EBv13 se fijaron en metanol/ácido acético (3/1) y se almacenaron durante una noche a -20°C. Al día siguiente, metafases fueron esparcidas sobre vidrio, teñidas mediante una disolución de Wright/Giemsa y observadas bajo el microscopio. Se observaron varias series de metafases, confirmando el origen de pollo de células EBv13. No se observa evidencia alguna de poliploidad.

7.1.4.- Influencia de la composición del medio de cultivo celular sobre el tamaño de los grumos de células EBv13

Los autores de la invención han encontrado que la concentración de calcio y magnesio en el medio exento de suero utilizado para el cultivo de células EBx y la infección tienen un impacto sobre el tamaño de los grumos. La Figura 10 muestra la disminución en el tamaño de los grumos cuando células EBv13 se hacen pasar de un medio con una alta concentración a una baja concentración de Ca²⁺ y Mg²⁺.

7.2- CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS DE CÉLULAS EBx DE PATO

7.2.1 - Morfología de células EBx de pato

Análisis por microscopía electrónica de transmisión de células de EBx® se realizaron por el Dr. A. Rivoire (Lyon, Francia). Células EBx® de pato exhiben una morfología de células madres embrionarias típica (es decir, una elevada relación núcleo-citoplásmica) que se asemeja al fenotipo de células madres embrionarias murinas y células EB14 de VIVALIS descritas en el documento WO2006/108846. Células EBx® de pato son pequeñas células redondas (diámetro ~ 10 µm) con un gran núcleo y nucléolo, con pseudópodos cortos que se extienden desde la membrana plasmática (Figura 4). Son altamente metabólicamente activas con un citoplasma rico en ribosomas y mitocondrias. Contienen numerosas vacuolas intracelulares, un sistema de Golgi muy desarrollado y un retículo endoplásmico granuloso.

7.2.2 - Expresión de telomerasa de células EBx® de pato

Se investigó la expresión de telomerasa durante diferentes fases de restablecimiento de células EBx® de pato utilizando el kit de detección de telomerasa de Roche (Telomerase OCR ELISA). Se encuentra, que la telomerasa se expresa altamente en células EBx® de pato adherentes, así como durante la privación de alimentadores, durante el proceso de adaptar las células EBx® de pato a la suspensión y durante la privación de alimentadores. La Figura 5 muestra que EB24 y EB26 de pato expresan un alto nivel de telomerasa, al igual que las células EB14 de pollo. EB66 de pato también expresan un alto nivel de telomerasa a lo largo de todos los pasajes de las células. Esta elevada actividad de telomerasa es estable en células EB66, después de la adaptación en diferentes SFM (Figura 15).

7.2.3 - Células EBx® de pato no exhiben actividad de transcriptasa inversa endógena alguna

La expresión de transcriptasa inversa endógena se investigó mediante análisis F-PERT directo (Lovatt et al., 1999, J. Virol. Methods, 82: 185-200) en células Clean (FRANCIA). Líneas de células EBx® de pato, EB24 (datos no mostrados), EB66 (datos no mostrados), EB26 y EB51 no exhiben actividad de transcriptasa inversa (RT) endógena alguna (Figura 6A). La actividad de RT se detectó en cultivo de células EB14 de pollo así como, en menor medida, en fibroblastos embrionarios de pollo derivados de una raza de pollo libre de patógenos específicos (SPF).

La presencia de partículas retrovirales endógenas, ya sean replicativas o no replicativas, en el sobrenadante del

cultivo celular de células EBx® de pato y de pollo se investigó mediante un ensayo ELISA, detectando el antígeno p27 de la cápside principal de la leucosis aviar (Figura 6B). Todas las líneas celulares EBx® de pato (EB26, EB51, EB24, EB66...), así como EBv13 de pollo no secretan antígeno p27 de ALV. En oposición, células EB14 de pollo expresan antígeno P27 de ALV.

5 7.2.4 - Células EBx de pato no segregan el virus de la leucosis aviar (ALV) replicativo

Se realizó el ensayo de co-cultivo de células EBx de pato con la línea de células QT6 de codorniz, que se sabe es sensible a ALVs endógenos y exógenos, para detectar la presencia de virus de pato replicativos endógenos. La Figura 7A describe el principio del co-cultivo de QT6. La presencia de virus replicativos es detectada mediante un ensayo ELISA, detectando el antígeno P27 de la cápside principal de la leucosis aviar. El ensayo demuestra que ninguna de las células EBx de pato sometidas a ensayo secretan ALV replicativo (es decir, competente para la replicación) (Figura 7B).

7.2.5 – Células EBx de pato expresan receptores del virus de la influenza aviar y humana

La detección de receptores a virus de la influenza aviar (Siaα2-3Gal) y humana (Siaα2-6Gal) sobre células EBx de pato se realizó mediante análisis del clasificador de células fluorescente, utilizando lectinas marcadas con digoxigenina (Boehringer):

- lectina aglutinina de Sambuca nigra (SNA) se une específicamente a Siaα2- 6Gal;
- lectina aglutinina de Maackia amurensis (MAA) se une específicamente a Siaα2-3Gal.

Células EB14 de pollo y EBx de pato se lavaron en HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 y se resuspendieron en el mismo tampón a una concentración final de 5.10⁶. Las células se incubaron durante 30 min en hielo, y luego durante 15 a 30 minutos adicionales en presencia de SNA o MAA. Células tratadas con lectina se lavaron en HEPES 10 mM, NaCl 150 mM pH 7,5 antes de la incubación en hielo durante 15 a 30 minutos con anticuerpo anti-digoxigenina marcado con FITC. Después, las células se lavaron en NaCl al 0,9% y se analizaron mediante FACS.

Células EB14 de pollo y EBx de pato expresan receptores de la superficie celular que comprenden oligosacáridos con residuos Siaα2-6Gal y Siaα2-3Gal (Figura 8).

25 7.2.6 - Cariotipo

El análisis del cariotipo se realizó para verificar la diploididad de células y el origen aviar de células EB26 y EB66 de pato. Células en la fase de crecimiento exponencial se recolectaron y trataron durante 3 a 6 horas mediante colcemida (0,6 mg/mL). Después del lavado y la centrifugación, se realizó un choque hipotónico sobre células con KCl (0,56%) durante 20 minutos. Subsiguientemente, células EB24 y EB66 de pato se fijaron en metanol/ácido acético (3/1) y se almacenaron durante una noche a -20°C. Al día siguiente, las metafases se esparcieron sobre vidrio, se tiñeron mediante una disolución de Wright/Giemsa y se observaron bajo el microscopio.

Se observaron varias series de metafases, confirmando el origen de pato de células EBx. No se observó evidencia alguna de poliploididad. La Figura 16 muestra el cariotipo diploide de células EBx66 de pato (Figura 16).

EJEMPLO 6: Replicación del virus de la viruela en líneas de células EBv13 de pollo

35 Se investigó la susceptibilidad de células EBv13 a infección por el virus de la viruela utilizando una vacuna Ankara modificada (MVA) recombinante, que codifica un gen GFP (proteína fluorescente verde).

Se utilizó el siguiente protocolo: tres días antes de la infección, 0,4 x 10⁶ células EBv13 (pasaje 188)/mL se siembran en matraces T175 bajo 40 mL de SFM Excell 65319 (SAFC) suplementado con glutamina 4 mM. La infección se realiza a una multiplicidad de infección de 10-2 TCID₅₀/célula (la reserva de MVA-GFP es 109,7 TCID/ml). Una hora después de la infección se añaden al matraz 60 ml de medio reciente. El cultivo y la infección se realizaron a 37°C, 7,5% de CO₂ y se agitaron a 60 rpm. Cada día después de la infección se recogió una parte alícuota de la suspensión de células y se congeló. Al término de la cinética, se realiza una evaluación de la productividad siguiendo el método de TCID₅₀. En síntesis, la titulación de virus MVA-GFP infecciosos se realizó en células DF-1. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano, a una densidad de 15 x 10³ células/pocillo en medio DMEM (Biowhittaker) suplementado con suero de ternero fetal (FCS) al 5% (SAFC) y L-glutamina 2 mM (Biowhittaker). Veinticuatro horas más tarde, las células se infectaron con muestras diluidas diez veces en serie en DMEM y se incubaron durante una semana a 37°C, 5% de CO₂ en una atmósfera humidificada. La infectividad del virus se midió a través de observación al microscopio del efecto citopático global (CPE) y células infectadas expuestas a UV. Después, los títulos de TCID₅₀ se calcularon de acuerdo con el método de Reed y Muench (1938, A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27, 493-97). A lo largo del experimento se vigilan la proliferación y viabilidad de las células. Células EBv13 Valo de pollo parecen ser

altamente sensibles a la infección por MVA-GFP (Figuras 3A-3B).

EJEMPLO 8: Replicación del virus de la viruela en líneas de células EBx de pato

Se investigó la susceptibilidad de células EBx de pato a la infección con virus de la viruela utilizando una vacuna Ankara modificada recombinante que codifica una GFP. La titulación del virus se realizó tal como se describe previamente para células EBv13 de pollo.

8.1 – Medio de cultivo celular

Células EBx de pato se almacenaron en crioviales en nitrógeno líquido a -196°C (20×10^6 células/vial). El criovial se descongela directamente en un baño de agua pre-calentado a $+37^{\circ}\text{C}$. La suspensión de células se coloca en un tubo estéril de 50 ml con 30 ml de medio de cultivo pre-calentado. Después de la centrifugación (5 min a $300 \times 20 \text{ g}$, a temperatura ambiente), se añaden 15 ml del medio de cultivo reciente al sedimento y se homogeneiza suavemente. La muestra se numera utilizando azul tripan. La numeración ha de ser $> 20 \times 10^6$ células y la viabilidad ha de ser $> 70\%$ para garantizar un buen cultivo.

La suspensión de células se extiende en un matraz T75 cm^2 y se incuba a $+37^{\circ}\text{C}$ bajo una atmósfera de 7,5% de CO_2 en un agitador orbital a 50 rpm. Después se añade diariamente medio reciente. Las células se hacen pasar entonces para aumentar la biomasa de las células para sembrar un biorreactor de 3 L. Se necesitan 320.106 células para inocular un biorreactor de 3 L. Se toma una muestra después de mezclar suavemente para realizar una numeración utilizando azul tripan para determinar la densidad celular. Se prepara una mezcla de células de 150 mL, con el fin de obtener una concentración celular de $0,4 \times 10^6$ células. ml^{-1} en el volumen de cultivo final de 800 ml en el biorreactor. Antes de sembrar las células, el pH se ajusta en el recipiente a 7,2 (ya que el pH disminuirá mediante inyección en superficie de CO_2). El pO_2 se establece en 50% de saturación de O_2 (el controlador del flujo másico se ajusta al 100%, que corresponde a un caudal de borboteo máximo de $50 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$). Al comienzo del proceso, el pH se mantiene mediante la inyección en superficie de CO_2 y posteriormente se controla mediante la adición de 7,5% de NaHCO_3 . La ventilación de la superficie se inicia con aire a un caudal de $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. La numeración de las células se realiza sobre una base rutinaria.

Después de 3 días de cultivo, la densidad celular debería ser mayor que $4-5 \times 10^6$ células. ml^{-1} . Si se alcanza la densidad celular esperada, la infección del virus se realiza a una m.d.i. de 10-4. La temperatura del recipiente se ajusta a 33°C . La cepa de virus se descongela en hielo. La mezcla de infección se prepara en 10 ml de medio de producción. Después de la inoculación de la mezcla de infección en el biorreactor, se realiza la adsorción viral durante 1 hora. Se prepara el medio de producción final: en 1,5 L de medio de producción, se añade tripsina con el fin de obtener una concentración final en el recipiente de $0,3 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($2,3 \text{ L}$ en total). Luego se añade el medio de producción final pre-calentado. Cada día se recoge del biorreactor una muestra de aproximadamente 15 ml para realizar la numeración de las células, el análisis de la morfología de las células y para observar el CPE. Los metabolitos tales como glutamato, glutamina, lactato y glucosa se analizan todos ellos a lo largo del cultivo con el software BioProfile Basic. Si es necesario, se ajusta la concentración de los metabolitos. Por ejemplo, si es necesario, se ajusta a 2 mM la concentración de glutamina. Si es necesario, la concentración de glucosa se ajusta a $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

La titulación del virus se lleva a cabo al final del experimento utilizando todas las muestras recogidas.

8.2 – Resultados

8.2.1 – La cinética de crecimiento de células EBx® de pato en un biorreactor alimentado por tandas de 3 L

Células EBx® de pato se cultivan rutinariamente en un biorreactor con tanque agitado. Se deja que la biomasa derivada de EBx® de pato se acumule a 37°C en un medio de crecimiento celular hasta alcanzar una densidad celular de $5-6 \cdot 10^6$ células/mL. Después, la mezcla se diluye entre 3 y 10 veces y la cinética del crecimiento celular se sigue a lo largo de un período de 10 días. En tales condiciones, la densidad celular de 12 a 20 millones de células/ml se alcanza rutinariamente en torno a los días 5 a 8. Así, células EBx® de pato exhiben un intervalo de relación de escisión que dura al menos 10 hasta 15 veces.

8.2.2 – Influencia de la composición del medio de cultivo celular sobre el tamaño de grumos durante infección con el virus MVA-GFP de células Ebx de pato

Los autores de la invención han encontrado que la concentración de calcio y magnesio en el medio exento de suero utilizado para el cultivo y la infección de células EBx puede tener un impacto sobre el tamaño de los grumos. La presencia de pequeños grumos de células EBx de pato mejora la infección y la propagación del virus, conduciendo a elevados títulos de virus de MVA (Figura 9A).

8.2.3 – Producción del virus MVA en biorreactor de 3 L

Se dejó que biomasa derivada de EBx® de pato se acumulara durante la fase de proliferación celular en medio de crecimiento Excell 66444. Después, las células se infectaron con 10⁻² TCID₅₀/célula de virus MVA-GFP, y la mezcla se diluyó en medio de producción Excell 66444. Después de la adición de medio Excell reciente, la densidad celular cayó el día 2, y el día 4 la densidad de células infectadas aumentó y alcanzó 12 millones de células/ml. En tales condiciones, la productividad de MVA-GFP es alta. Desde el día 4 post-infección, el título de MVA-GFP es de alrededor de 10⁸ TCID₅₀/ml (Figura 9B). En células EBx® de pato se obtuvo un rendimiento de MVA-GFP de 205 TCID₅₀/célula.

EJEMPLO 9: Producción del virus de la gripe en líneas celulares EBx de pato

9.1 – Materiales y métodos

9.1.1 – Ensayo de infectividad del virus de la influenza (TCID₅₀)

La titulación del virus de la influenza infeccioso se realizó en células MDCK. En síntesis, las células se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano a una densidad de 3 x 10³ células/pocillo en medio UltraMDCK, suplementado con L-glutamina 2,5 mM. Veinticuatro horas más tarde, las células se infectaron con muestras diluidas en serie diez veces en UltraMDCK que contenía 6 µg.mL⁻¹ de tripsina-EDTA y se incubaron durante una semana a 33°C, 5% de CO₂ en una atmósfera humidificada. La replicación del virus se sometió luego a ensayo en un ensayo HA utilizando glóbulos rojos de pollo y los títulos de TCID₅₀ se calcularon de acuerdo con el método de Reed y Muench (1938)*. *Reed L, Muench H, 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27, 493-97.

9.1.2 – Ensayo de inmunodifusión radial simple (SRID)

La concentración de hemoaglutinina en muestras derivadas de células EB14, infectadas con el virus de la influenza se determinó según se describe por Wood y colaboradores*. En síntesis, placas de vidrio se revistieron con un gel de agarosa que contenía suero anti-influenza (concentración recomendada proporcionada por NIBSC). Después de haberse sedimentado el gel, se cargaron 10 µL de diluciones apropiadas de la referencia y de las muestras en pocillos troquelados de 3 mm de Ø. Después de incubación durante 18-24 h en una cámara húmeda a la temperatura ambiente, las placas se empaparon en NaCl al 0,9% y se lavaron en agua destilada. El gel se prensó luego y se secó. Las placas se tiñeron en disolución azul brillante de Coomassie durante 15 min y se destiñeron dos veces en una mezcla de metanol y ácido acético hasta que las zonas teñidas, claramente definidas, se volvieron visibles. Después de secar las placas, se midió en dos direcciones en ángulos rectos el diámetro de las zonas teñidas que rodean a los pocillos de antígeno. Se construyeron curvas de dosis-respuesta de diluciones de antígeno frente a la superficie, y los resultados se calcularon de acuerdo con métodos de ensayo de la relación de pendiente convencionales. *Wood JM. et al. "An improved single-radial-immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: application for potency determinations of inactivated whole virus and subunit vaccines" (J. Biol. Stand., 1977, 5(3):237-47).

9.1.3 – Análisis de transferencia Western de proteína hemoaglutinina de la influenza

Se realizó una SDS-PAGE según se describe por Laemmli UK (1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 259:680-685) en gel de poli(acrilamida al 10%). Proteínas desnaturadas (SDS al 1%, β-mercapto-etanol 70 mM) se transfirieron a una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (hybond P, Amersham) mediante un proceso de transferencia semiseca (Kyhse-Andersen J (1984) Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose (J. Biochem Biophys Methods 10:203-209). Los borrones se bloquearon durante 1 h a la temperatura ambiente una mezcla compuesta de leche en polvo seca con 5% de grasa en TBST suplementado con FCS al 1% (SAFC). Después, los borrones se incubaron durante una noche en disolución de bloqueo suplementada con suero de oveja anti-HA policlonal específico (1:500 (NIBSC)). Los borrones se lavaron 6 veces con TBST y se incubaron durante 1 h a la temperatura ambiente con un anticuerpo policlonal anti-IgG de oveja de conejo conjugado con hrp (1:5000 (Rockland)) en disolución de bloqueo. Después de 6 lavados con TBST, el complejo proteína –conjugado se reveló finalmente utilizando quimioluminiscencia (kit ECL, Amersham) y películas (Hyperfilm, Amersham).

9.2 – Infección por el virus de la influenza de células EBx® de pato en biorreactor de 3L

9.2.1 – Materiales y equipo

50 Material para descongelación de células

o Matrices T75 cm² (Sarstedt, Nº de Cat. 831813502)

o Medio de cultivo (medio exento de suero)

o L-glutamina 200 mM (Biowhittaker, N° de Cat. BE17-605E)

o Agitador orbital IKA KS260 (Fisher Bioblock, N° de Cat. F35044)

Material para la amplificación celular

o Matrices T175 cm2 (Sarstedt, N° de Cat. 831812502)

5 o Medio de cultivo (medio exento de suero): Excell 65319 (JRH, N° de Cat. 65319-1000M1687) añadido con glutamina 2,5 mM

o L-glutamina 200 mM (Biowhittaker, N° de Cat. BE17-605E)

o D (+) glucosa (45 %) (Sigma, N° de Cat. G8769)

Material de producción

10 o Medio de producción (medio exento de suero) : Excell 65629 (JRH, N° de Cat. 65629) suplementado con glutamina 2,5 mM

o L-glutamina 200 mM (Biowhittaker, N° de Cat. BE17-605E)

o D (+) glucosa (45 %) (Sigma, N° de Cat. G8769)

o Trypzean 1X (Sigma, N° de Cat. T3449)

15 o Disolución de bicarbonato de sodio al 7,5 % (Sigma, N° de Cat. 205-633-8)

o Cepa del virus influenza (congelada a -80°C)

9.2.2 – Método de cultivo celular

(Igual que para la replicación de MVA – Ejemplo 7.1)

20 La titulación del virus en los ensayos de hemoaglutinina (HAU) y las cuantificaciones de antígeno HA (transferencia Western, SRID) se llevan a cabo al término del experimento utilizando todas las muestras recogidas.

9.3 – Resultados

Los autores de la invención demuestran que células EBx de pato son un sustrato de célula fiable y eficaz para la replicación de diversas cepas A y B del virus de la influenza. La producción del virus de la influenza se puede realizar en diversos recipientes, tales como matraces, recipientes rotatorios (datos no mostrados) y biorreactores.

25 Por parte de los autores de la invención se obtuvo un proceso de tandas alimentadas reproducible y eficaz de producción del virus de la influenza en biorreactores con tanque agitado de 3 L y 30 L. El rendimiento viral por encima de 15 mg/l y hasta 50 mg/l de hemoaglutinina se obtiene rutinariamente en matraces y en biorreactores con cepas A y B del virus de la influenza (Figuras 11 y 12).

EJEMPLO 10: Replicación del virus de la enfermedad de Newcastle en líneas de células EBx de pato

30 La susceptibilidad de células EBx de pato a infección con el virus de la enfermedad de Newcastle se investigó utilizando una cepa La Sota de NDV.

10.1 – Métodos

Células EBx® de pato se hicieron crecer en medio Excell (SFAC) en matraces T175 a 37°C bajo una atmósfera de 7,5% de CO₂, en un agitador orbital a 60 rpm. El día 0, las células se siembran a razón de 0,4 x 10⁶ células/mL en 40 ml de medio reciente. El cultivo celular se incubó a 37°C, 7,5% de CO₂, bajo sacudimiento (60 rpm). La cinética del crecimiento de células fue seguido hasta que la densidad celular había alcanzado una concentración entre 4 x 10⁶ y 6 x 10⁶ células/ml (habitualmente el día 3 post-siembra). En ese punto, las células se inoculan con la cepa La Sota de NDV a dos m.d.i. diferentes (10-3 y 10-4 TCID₅₀/células) y se incuban durante una hora adicional a 37°C y 7,5% de CO₂, bajo sacudimiento (60 rpm). Después, el cultivo celular se diluyó con la adición de 60 mL de medio de producción viral reciente y la incubación se prosiguió a 37°C y 7,5% de CO₂, bajo sacudimiento (60 rpm). Las cinéticas del crecimiento celular y de producción del virus se realizaron a lo largo de 7 días. Como fuente de protesa se añadió tripsina recombinante (SAFC) cada día al medio de cultivo; se sometieron a ensayo dos concentraciones de tripsina (0,4 y 0,75 USP/mL). Para la numeración de células, la titulación del virus y el análisis por transferencia Western se separaron diariamente partes alícuotas.

5 Las muestras se separaron utilizando SDS-PAGE al 10% y se transfirieron sobre una membrana de PDVF (Amersham) mediante la técnica semi-seca. La inmunodetección se realizó utilizando antisuero policlonal de pollo contra NDV (1:2000, CHARLES RIVER Laboratories), seguido de anti-pollo de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (1:5000, SIGMA). El anticuerpo secundario ligado se detectó utilizando el kit del sistema de detección por quimioluminiscencia ECL (ROCHE).

10.2 – Resultados

Células EBx de pato y pollo son sensibles y replican la cepa La Sota de NDV. Títulos (en TCID₅₀/ml) de NDV producidos en células EBx® de pato aumentan desde el día 0 al día 2 pi para alcanzar una media de 106,83 TCID₅₀/mL (Figura 13, panel izquierdo).

10 El análisis de la transferencia Western (Figura 13, panel derecho) mostró expresión de proteínas virales NDV (HN, Fo/F, NP y M). La composición de proteínas virales del virus NDV producidas en células EBx® de pato es similar a la obtenida con el virus NDV producido en células EBx® de pollo. Además, la cinética de liberación de los virus producidos en células EBx de pollo y pato son similares.

EJEMPLO 11: Replicación del virus del sarampión en células EB66 de pato

15 La susceptibilidad de células EB66 de pato a la infección con el virus del sarampión se investigó utilizando una proteína verde fluorescente que expresa el virus del sarampión recombinante.

11.1 – Métodos

20 Células EB66 se hicieron crecer en medio Excell en matraces T175 a 37°C, bajo una atmósfera de 7,5% de CO₂, en un agitador orbital a 60 rpm. El día 0, las células se siembran a razón de 0,4 x 10⁶ células/mL en 40 ml de medio reciente. El cultivo celular se incubó a 37°C, 7,5% de CO₂, bajo sacudimiento (60 rpm). La cinética del crecimiento de células fue seguido hasta que la densidad celular había alcanzado una concentración entre 4 x 10⁶ y 6 x 10⁶ células/ml (habitualmente el día 3 post-siembra). En ese punto, las células se inoculan con virus del sarampión recombinante a dos m.d.i. diferentes (10-1 y 10-2 TCID₅₀/células) y se incuban durante una hora adicional a 37°C, 7,5% de CO₂, bajo sacudimiento (60 rpm). Después, el cultivo celular se diluyó con la adición de 60 mL de medio de producción viral reciente y la incubación se prosiguió a 37°C y 7,5% de CO₂, bajo sacudimiento (60 rpm). La cinética del crecimiento de células y de producción del virus se realizó a lo largo de 7 días. Para la numeración de las células y la titulación del virus se separaron diariamente partes alícuotas.

11.2 – Resultados

30 Células EB66 son sensibles al y replican el virus del sarampión. En condiciones no optimizadas, los títulos (en TCID₅₀/ml) de sarampión producido en células EB66 alcanzan una media de 107 TCID₅₀/mL (Figura 14).

REIVINDICACIONES

- 1.- Un procedimiento para obtener líneas celulares aviares diploides continuas, derivadas de células madres embrionarias (ES) aviares, en el que dichas líneas celulares aviares son capaces de proliferar en un medio basal en ausencia de factores de crecimiento y capa alimentadora y no producen partículas de retrovirus endógenos competentes para la replicación, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- 5
- a) aislar embrión o embriones de pájaros en una fase del desarrollo en torno a la oviposición, en donde dichos pájaros se seleccionan del orden de los Anseriformes y el genoma de dichos pájaros no contiene secuencias provirales endógenas susceptibles de producir partículas retrovirales endógenas competentes para la replicación;
- 10
- b) suspender células madres embrionarias (ES) aviares, obtenidas disociando embrión o embriones de la etapa a) en un medio de cultivo basal suplementado con:
- factor de crecimiento de insulina tipo 1 (IGF-1) y factor neurotrófico ciliar (CNTF); y
 - suero animal;
- 15
- c) sembrar la suspensión de células ES obtenida en la etapa b) sobre una capa de células alimentadoras, y cultivar adicionalmente las células ES durante al menos un pasaje;
- d) retirar IGF-1 y CNTF del medio de cultivo, y cultivar adicionalmente las células ES aviares durante al menos un pasaje;
- 20
- e) disminuir progresivamente la concentración de células alimentadoras en el medio de cultivo con el fin de obtener una retirada total de la capa alimentadora después de varios pasajes y cultivar adicionalmente las células;
- f) obtener líneas celulares aviares adherentes, derivadas de células ES, capaces de proliferar en un medio basal en ausencia de factores de crecimiento, y una capa alimentadora, y en donde dichas líneas celulares aviares no producen partículas de retrovirus endógenos competentes para la replicación.
- 25
- 2.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que después de la etapa e), la concentración de suero animal en el medio de cultivo se reduce progresivamente con el fin de obtener una retirada total de suero animal después de varios pasajes.
- 30
- 3.- El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dichas líneas de células aviares adherentes están adaptadas a condiciones de cultivo en suspensión.
- 4.- El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la retirada de los factores de crecimiento IGF-1 y CNTF del medio de cultivo en la etapa d) se realiza simultáneamente.
- 35
- 5.- El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho pájaro es un pato.
- 6.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho pájaro es un pato de Pekín.
- 7.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho pájaro es un pato de Muscovy.
- 40
- 8.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el huevo de dicho pato de Muscovy se incuba hasta la madurez antes de aislar el embrión de pato.

9.- El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dichas líneas celulares aviares diploides continuas tienen al menos una de las siguientes características:

- una elevada relación núcleo-citoplásmica,
- una actividad de telomerasa endógena,
- 5 - un diámetro de alrededor de 10 µm:
- un tiempo de duplicación de la población de alrededor de 30 horas o menos a 37°C;
- dichas células expresan uno o más marcadores adicionales, seleccionados del grupo que comprende fosfatasa alcalina, SSEA-1, EMA-1, ENS1,

y en el que dichas células no producen partículas de retrovirus endógenos competentes para la replicación.

10

10.- Un procedimiento para la replicación de un virus en una línea de células aviar diploide continua obtenidas mediante el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende las etapas:

- a) infectar dichas células aviares con un virus de interés;
- b) cultivar dichas células aviares infectadas con el fin de replicar dicho virus;
- 15 c) recolectar el virus en el sobrenadante del cultivo celular y/o dentro de dichas células.

20

11.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho virus se selecciona del grupo que comprende virus de la viruela, ortomixovirus, paramixovirus, virus herpes, hepadnavirus, adenovirus, parvovirus, reovirus, circovirus, coronavirus, flavivirus, togavirus, birnavirus y retrovirus.

12.- El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho virus se selecciona del grupo que consiste en:

- un virus de la viruela o un virus de la viruela recombinante, seleccionado entre el grupo que comprende virus vacuna Ankara modificado (MVA), virus de la vacuna cepa Lister-Elstree, virus de la vacuna LC16m8, virus de la vacuna CVI78, virus de la viruela del gallo, virus de la viruela del canario (es decir, ALVAC), NYVAC, virus de la juncopox, virus mynahpox, virus de la viruela de la paloma, virus de la psittacinepox, virus de la viruela de la codorniz, virus de la viruela del gorrión, virus de la viruela del estornino, virus de la viruela del pavo;
- 25 - un paramixovirus o un paramixovirus recombinante seleccionado entre el grupo que comprende virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la rubeola, virus Sendai, virus respiratorio sincitial (RSV), para-influenza tipos I y III humana, virus de la peste bovina, virus del moquillo canino, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la para-influenza de pato;
- 30 - un ortomixovirus, un ortomixovirus recombinante o un ortomixovirus reordenado, seleccionado entre virus de la influenza humana, virus de la influenza aviar, virus de la influenza porcina, virus de la influenza equina, virus de la influenza felina;
- 35 - un togavirus, preferiblemente seleccionado entre virus Sinbis, virus del bosque Semliki, virus O'nyong'nyong, virus Chikungunya, virus Mayaro, virus del río Ross, virus de la encefalitis equina del este, virus de la encefalitis equina del oeste, virus de la encefalitis equina venezolana, o un togavirus recombinante de los mismos;
- 40 - un retrovirus, seleccionado entre virus de la reticuloendoteliosis, virus de la anemia infecciosa del pato, virus de la necrosis del bazo por parásitos chupadores o un retrovirus recombinante de los mismos;
- un parvovirus de pato o un parvovirus recombinante del mismo;
- 45 - un adenovirus, seleccionado entre adenovirus del gallo, adenovirus del ganso, adenovirus del pato y adenovirus de la paloma, o un adenovirus recombinante de los mismos;

- un birnavirus, preferiblemente el virus de la enfermedad bursal infecciosa; y
- un flavivirus, preferiblemente seleccionado entre el virus Dengue, virus de la encefalitis japonesa y virus del oeste del Nilo.

5 13.- Un procedimiento para la producción de proteínas y péptidos recombinantes, que comprende las etapas de:

- a. modificar genéticamente las líneas celulares aviares diploides continuas obtenidas mediante el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, mediante transfección transitoria o estable de un vector de expresión;
- 10 b. seleccionar dichas líneas celulares aviares genéticamente modificads que expresan dichas proteínas o péptidos recombinantes; y
- c. purificar los péptidos o proteínas recombinantes.

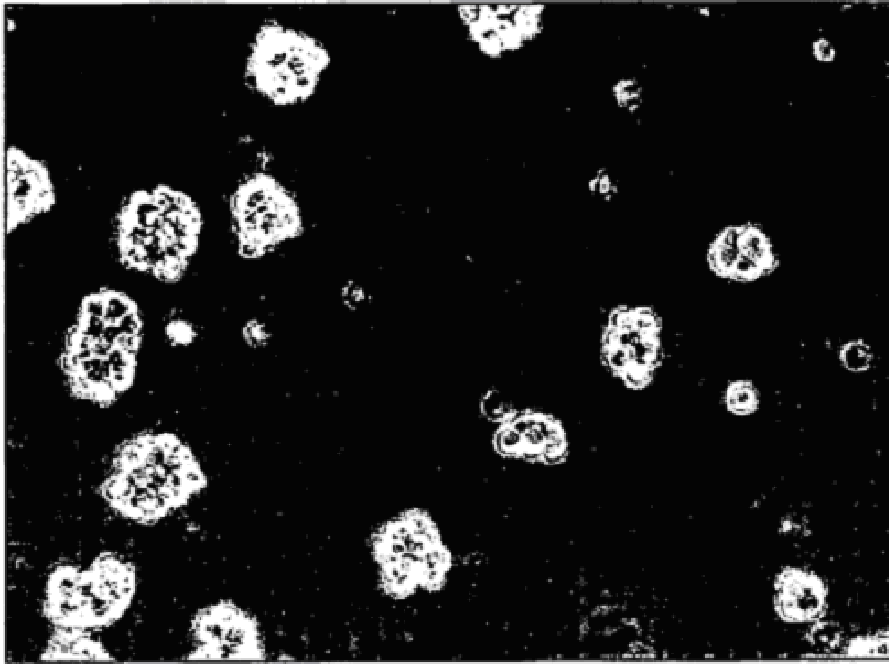


FIGURA 1A



FIGURA 1B

Actividad de Telomerasa

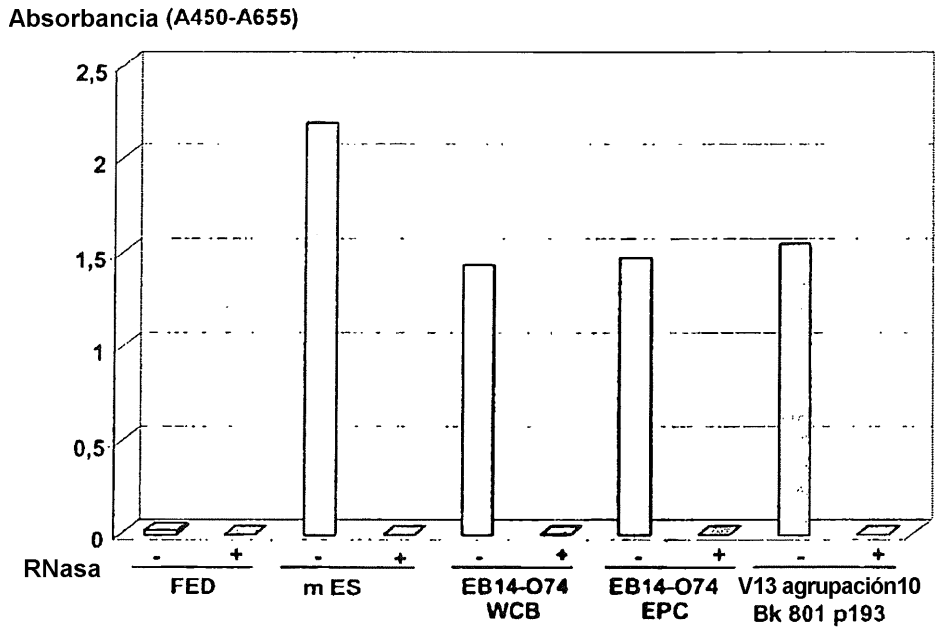


FIGURA 2

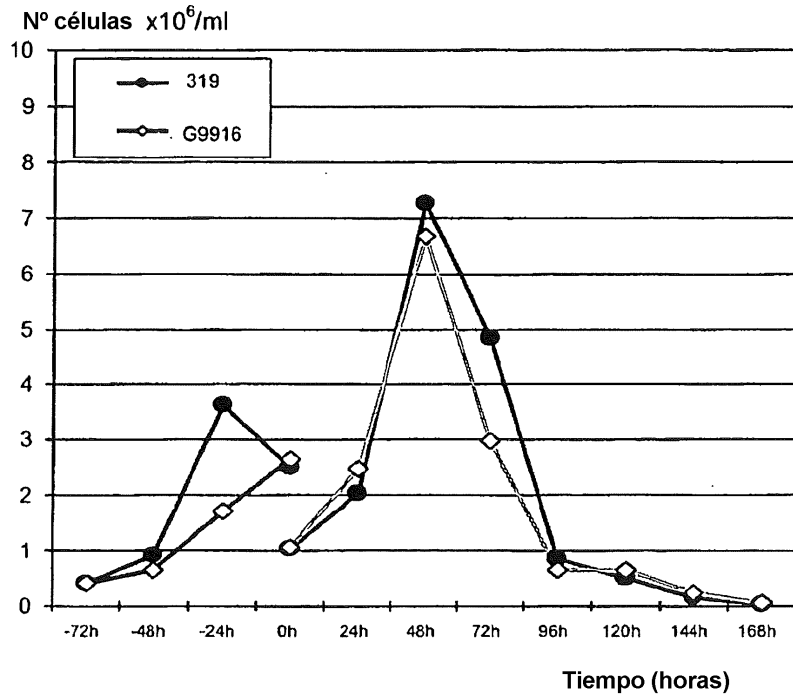


FIGURA 3A

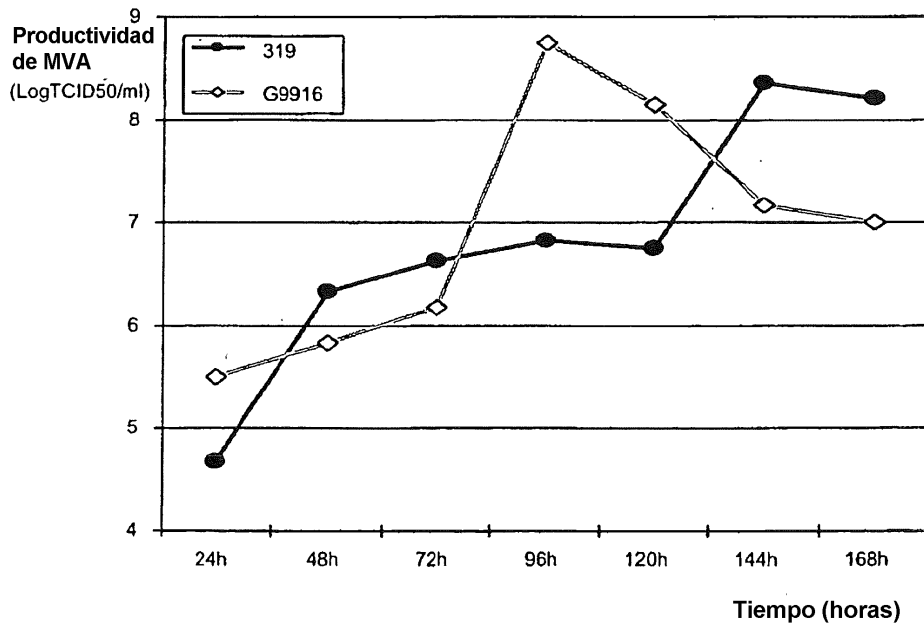


FIGURA 3B

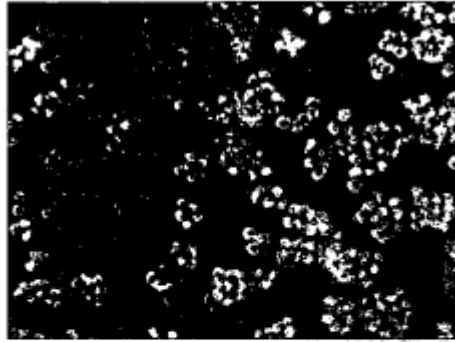


FIGURA 4A

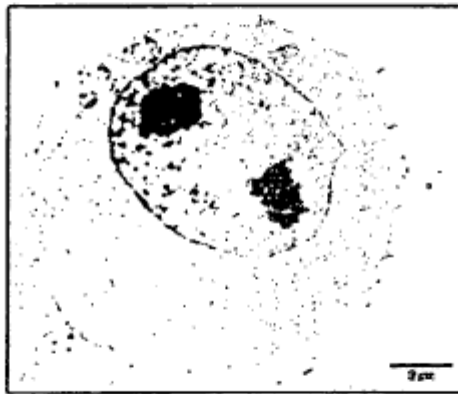


FIGURA 4B



FIGURA 4C

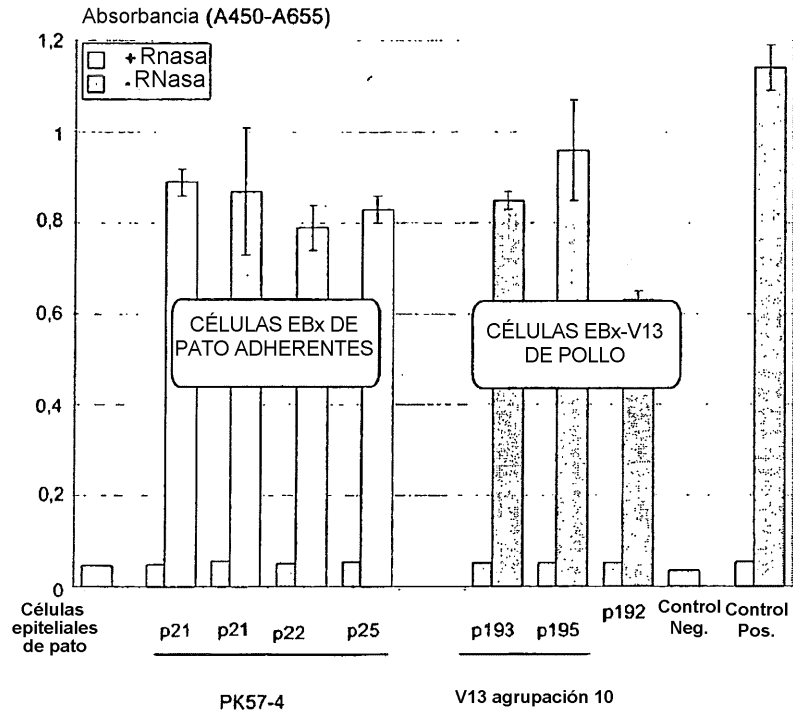


FIGURA 5A

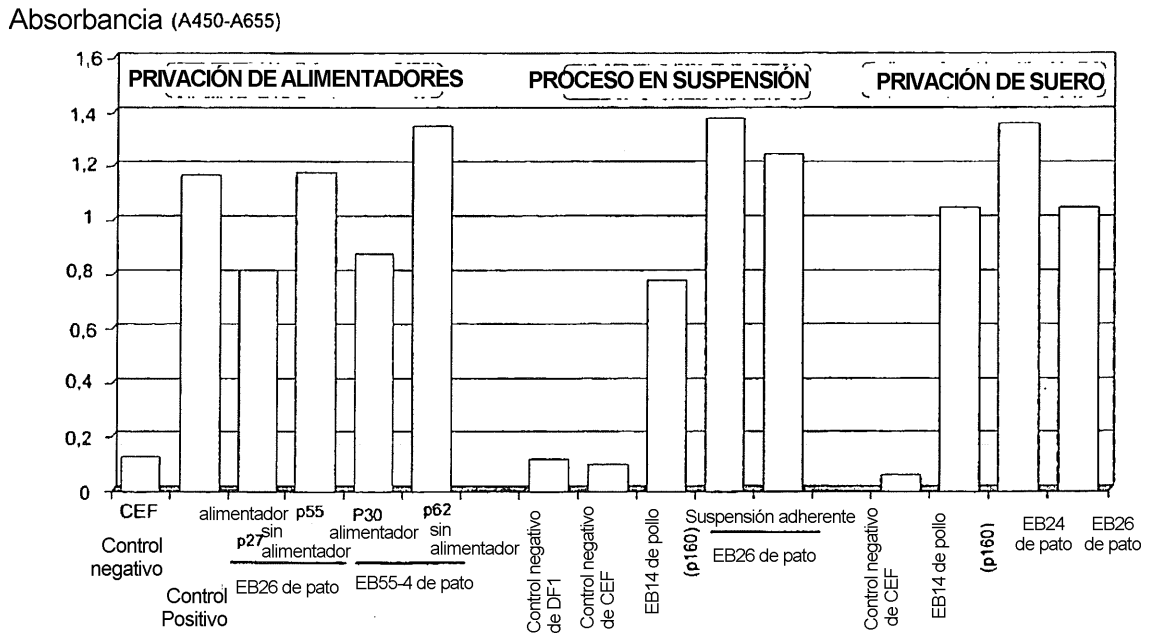


FIGURA 5B

Actividad de RT (en $U \times 10^7 / \mu g$ de proteínas)

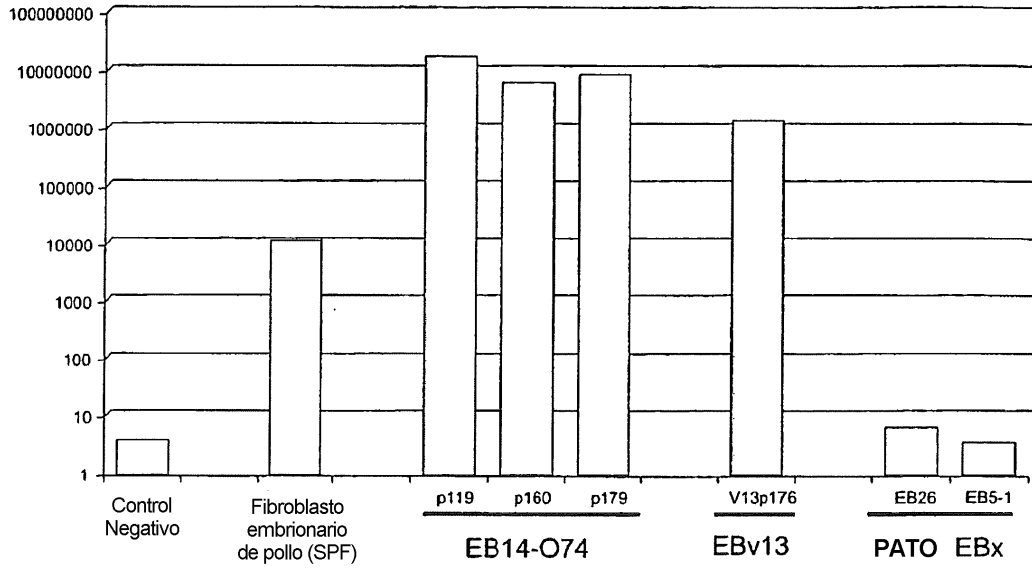


FIGURA 6A

Ensayo de ELISA de p27 de ALV

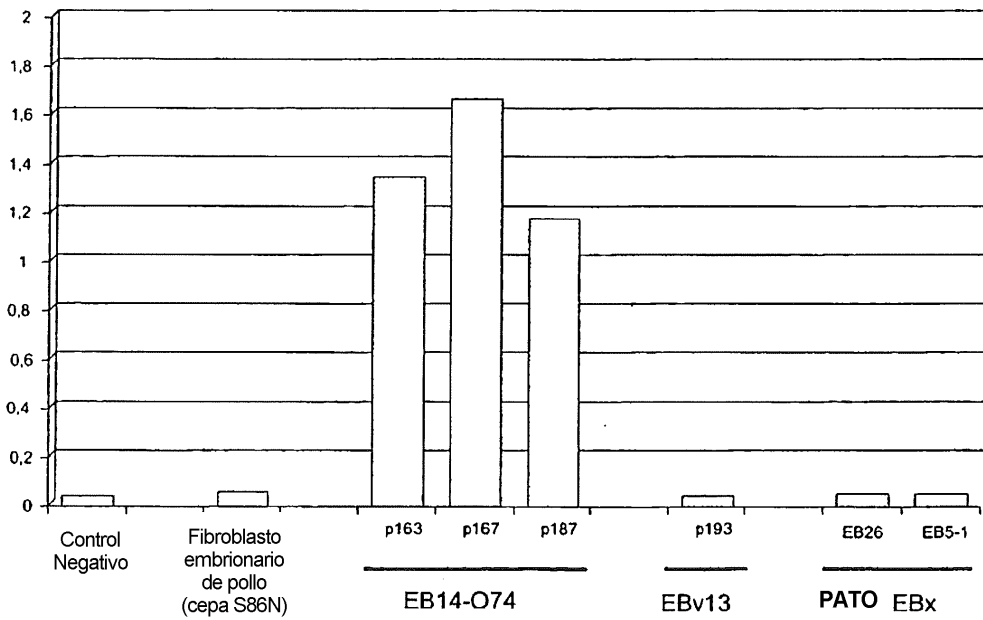


FIGURA 6B

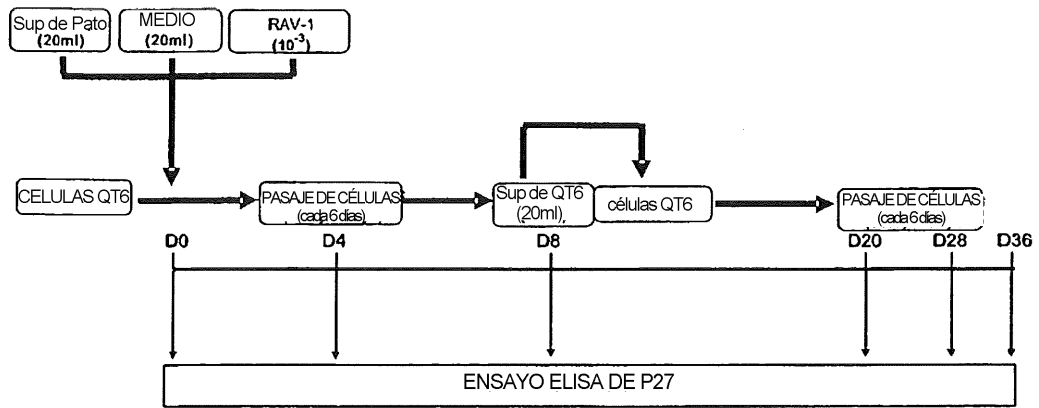


FIGURA 7A

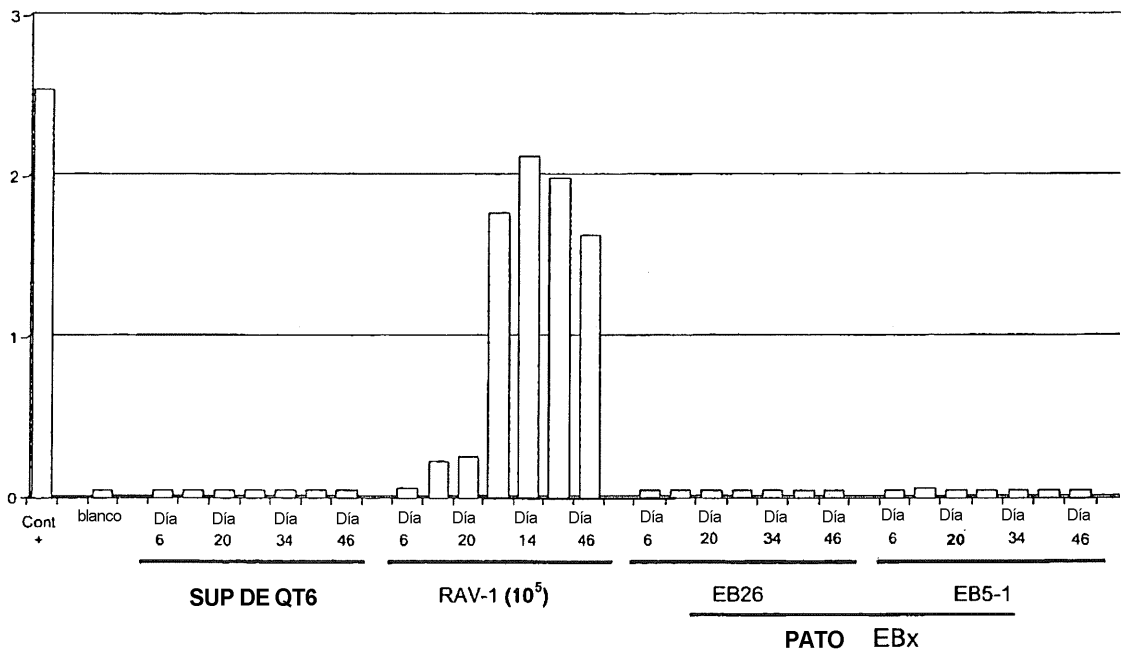


FIGURA 7B

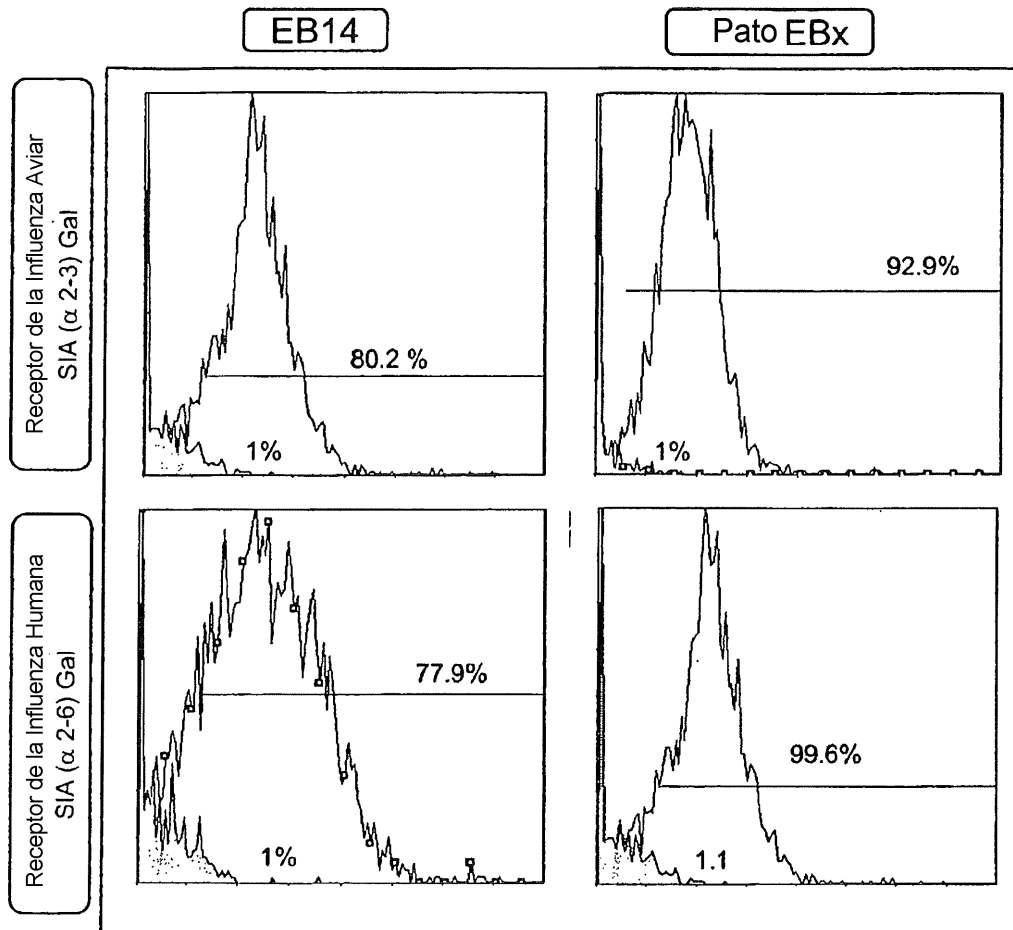


FIGURA 8

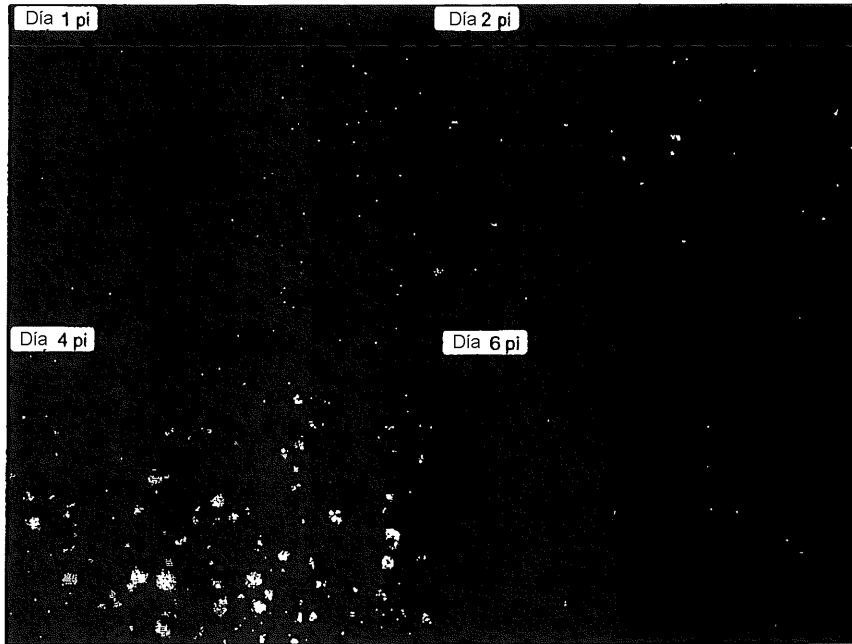


FIGURA 9A

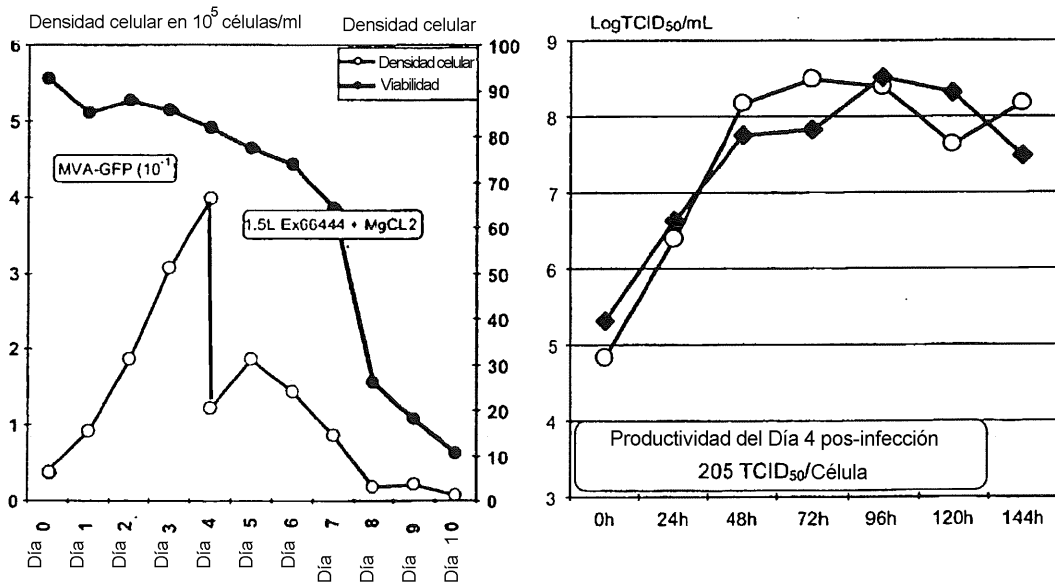


FIGURA 9B

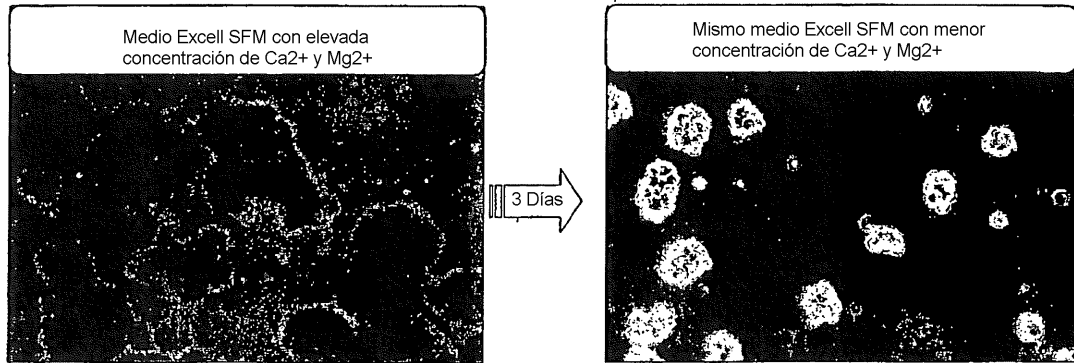


FIGURA 10A

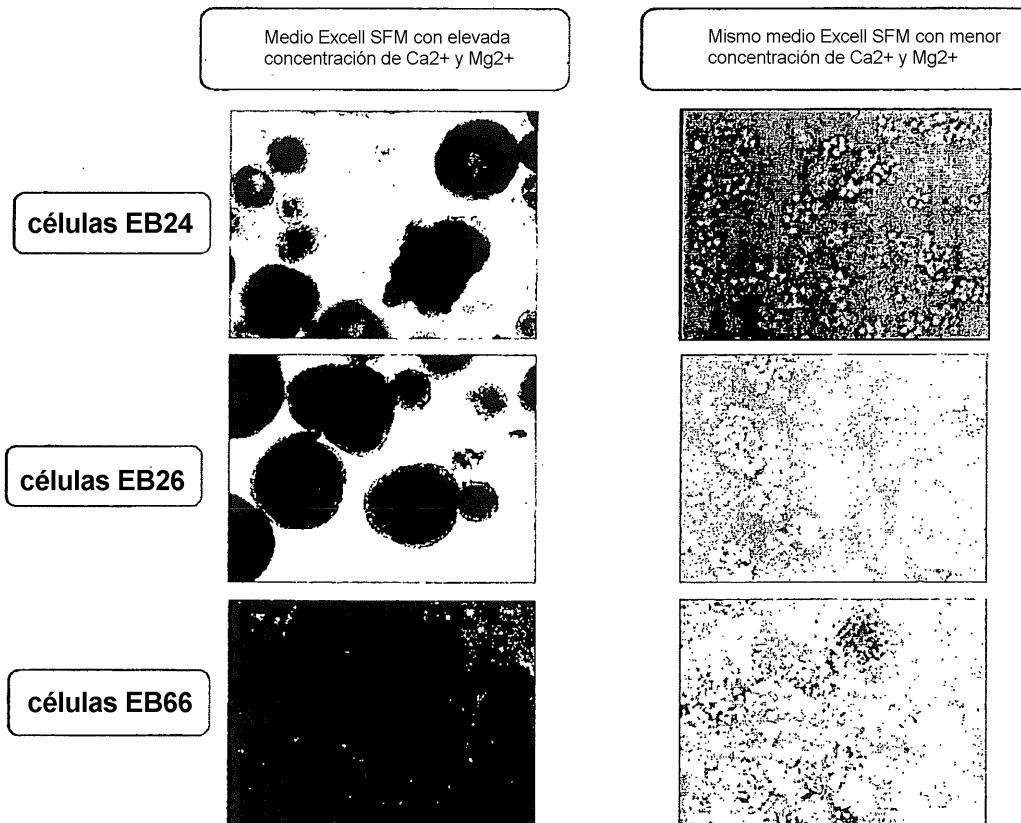


FIGURA 10B

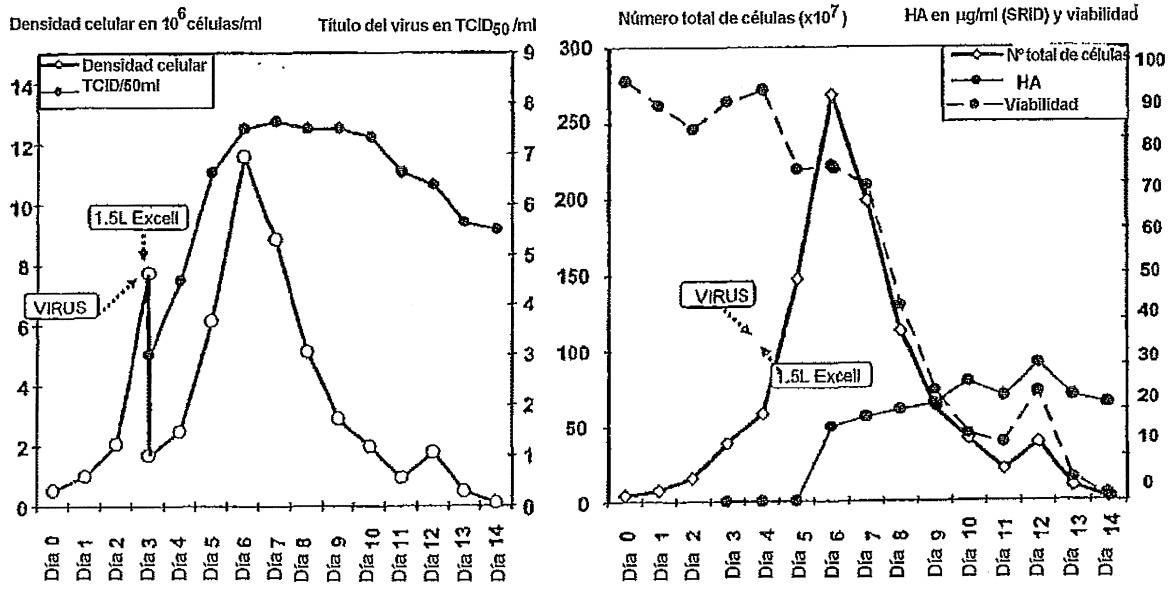


FIGURA 11A

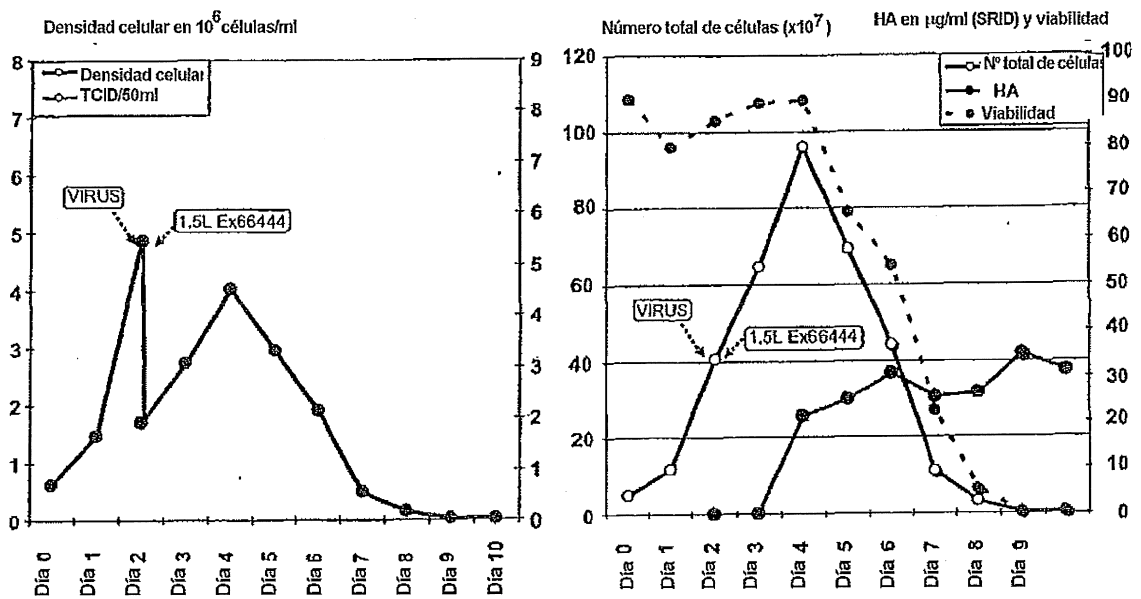


FIGURA 11B

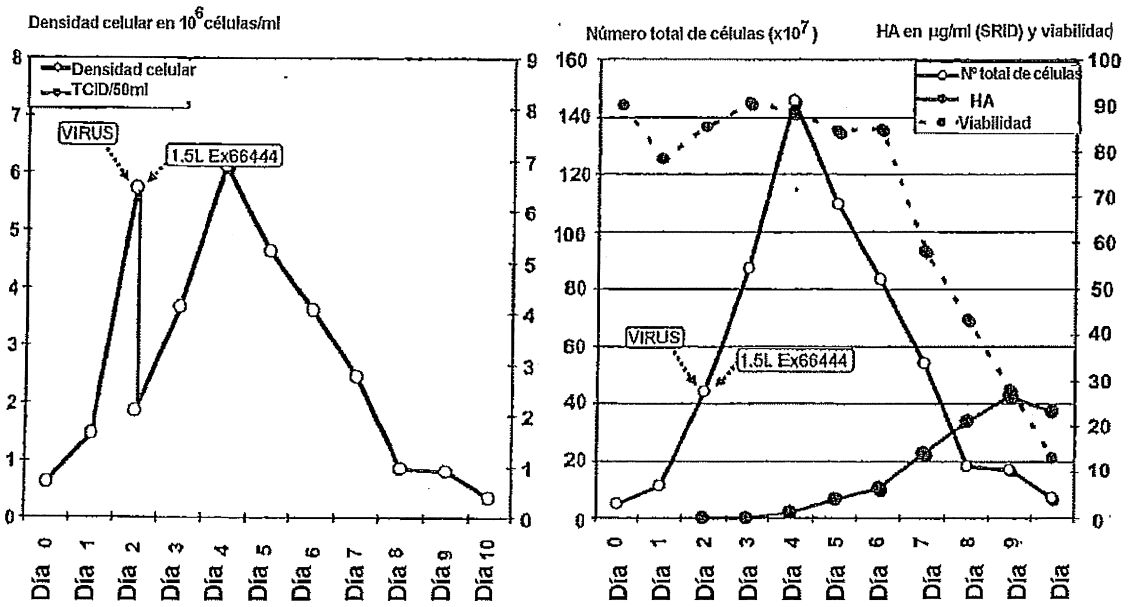


FIGURA 12

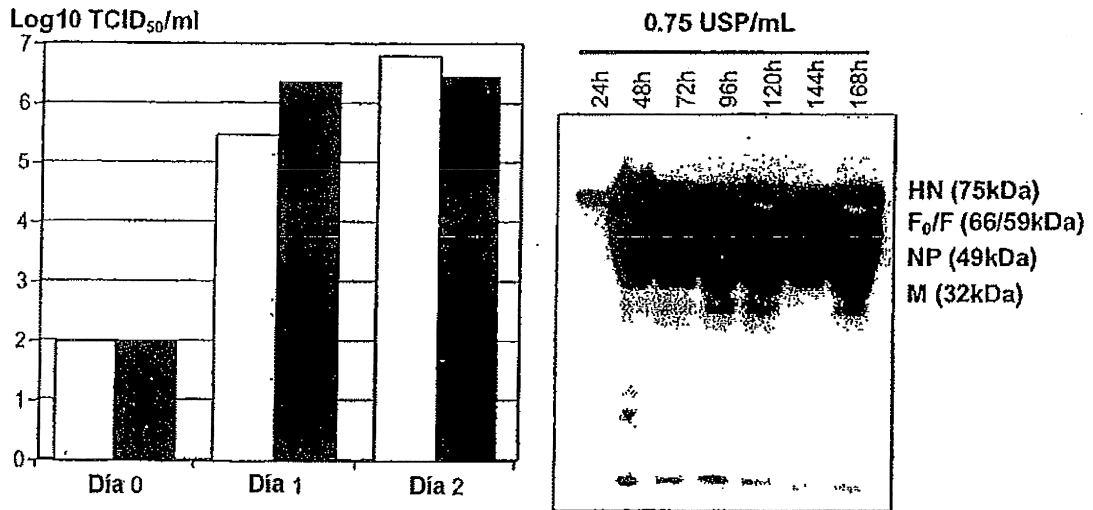


FIGURA 13

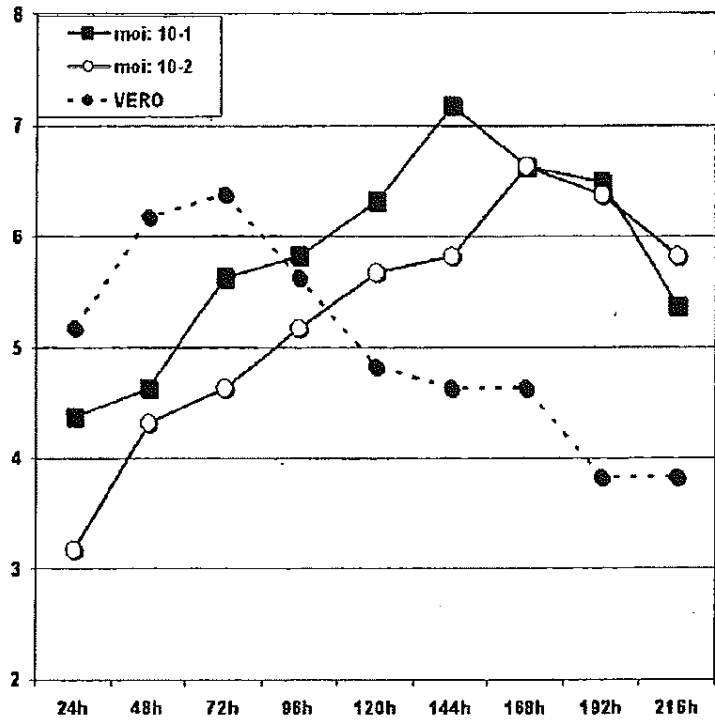


FIGURA 14

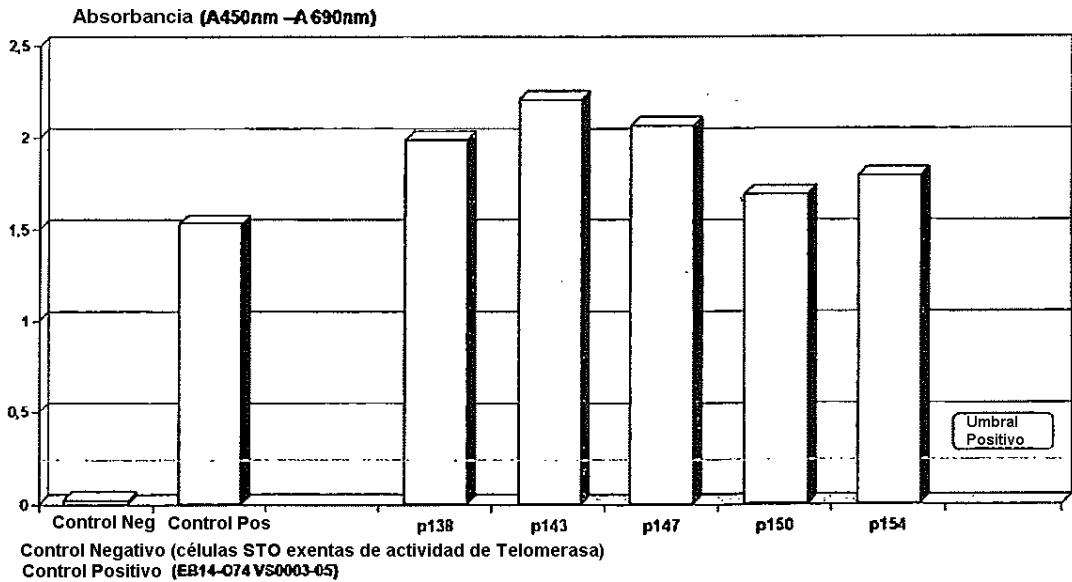


FIGURA 15A

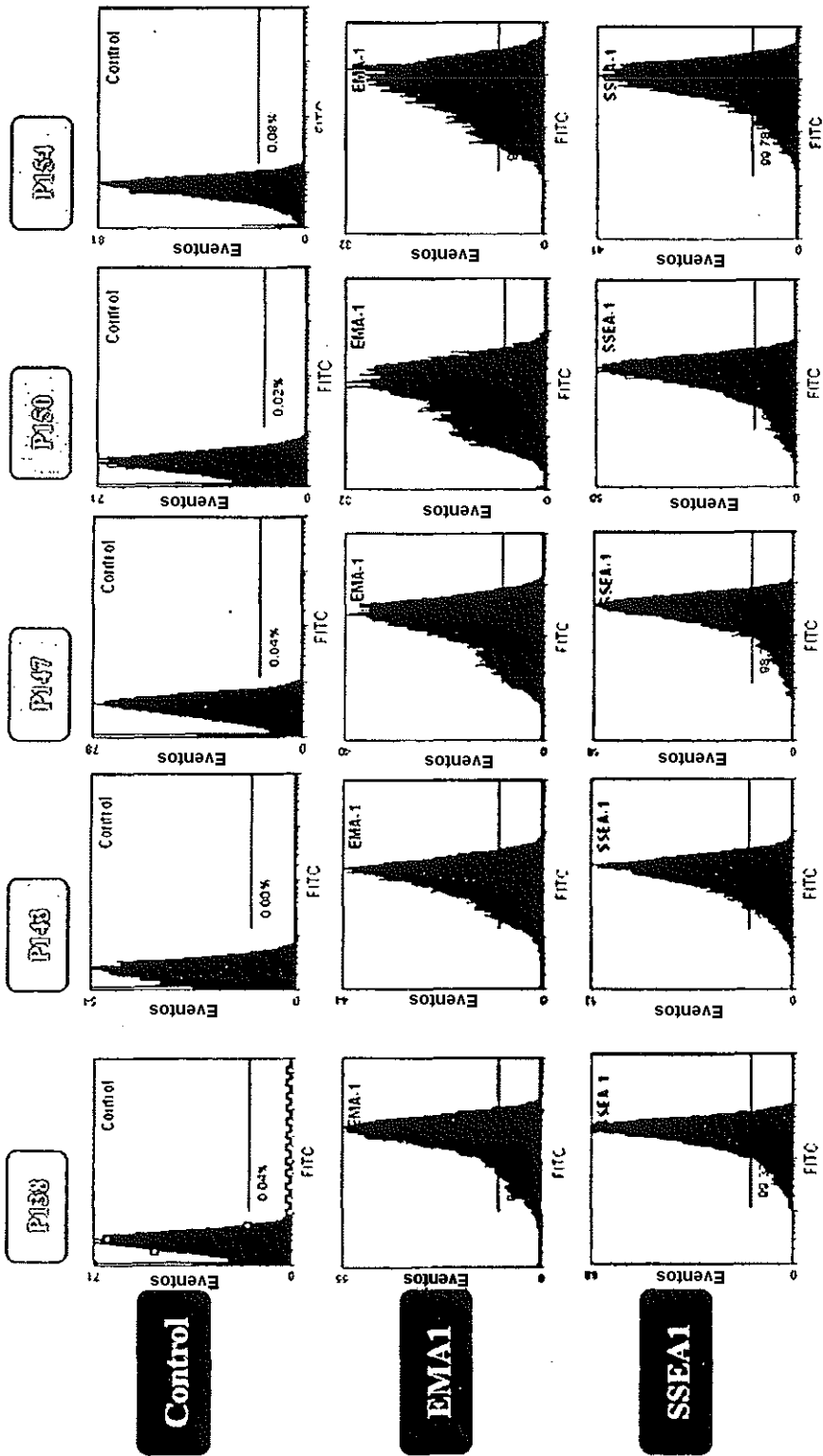


FIGURA 15B

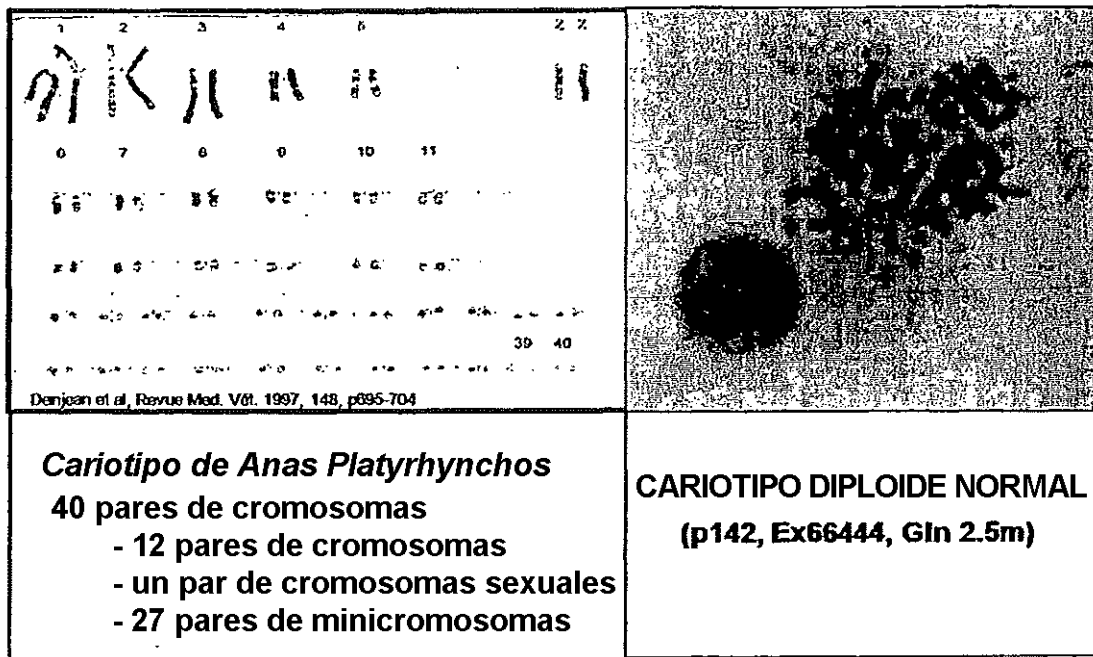


FIGURA 16