

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 081**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0735 (2010.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.02.2006 PCT/US2006/003690**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.08.2006 WO06084035**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2006 E 06734219 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 1850659**

54 Título: **Cultivo a largo plazo de células germinales primordiales de pollo**

30 Prioridad:

01.02.2005 US 49229
15.08.2005 US 204879

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2017

73 Titular/es:

ALEXION PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
100 College Street
New Haven, CT 06510, US

72 Inventor/es:

VAN DE LAVOIR, MARIE-CECILE y
LEIGHTON, PHILIP, A.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 615 081 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

Cultivo a largo plazo de células germinales primordiales de pollo

Los animales transgénicos ofrecen la posibilidad de avances extraordinarios en la producción sostenible de productos farmacéuticos valiosos, tales como anticuerpos. Sin embargo, la producción de animales transgénicos implica obstáculos técnicos significativos que solamente se han superado para unas pocas especies. La capacidad de incorporar modificaciones genéticas que codifican proteínas en el ADN de una especie para una expresión específica requiere varias técnicas diferentes que se deben desarrollar para cada especie. Una aproximación para alterar las características genéticas y físicas de un animal es introducir células en embriones receptores del animal. Estas células tienen la capacidad de contribuir al tejido de un animal nacido del embrión receptor, y contribuir al genoma de la descendencia transgénica del animal resultante.

Se ha destinado un gasto significativo de tiempo y recursos al estudio y desarrollo de líneas celulares, a la manipulación del genoma de las células, y a las técnicas de cultivo celular que permiten mantener tales células modificadas en cultivo. Aunque se han hecho muchos intentos, la capacidad de mantener la pluripotencia de las células modificadas en cultivo solamente se ha conseguido en unas pocas especies. Si se dispusiera fácilmente de cultivos celulares sostenibles y se pudieran realizar modificaciones mediante ingeniería genética a la vez que se mantuviera la pluripotencia, se dispondría de una amplia aplicación de técnicas nuevas.

En ciertos casos, las células se pueden modificar con un transgén que contiene el ADN que codifica un producto exógeno, tal como una proteína o un anticuerpo. El transgén contiene el proyecto para la producción de la proteína, y contiene suficientes elementos codificantes y reguladores para posibilitar la expresión de la proteína en el tejido del animal que se crea a partir de la inserción de las células en un embrión receptor. En ciertas circunstancias, se desea que la expresión sea ubicua, de forma que la expresión se da en todos los tipos de tejido. Sin embargo, en otras circunstancias, tales como la recogida de un anticuerpo valioso, la expresión se debe limitar a ciertos tipos de tejidos específicos, que facilitan la recogida de la proteína expresada. Por ejemplo, en vacas, la expresión de una proteína en la leche posibilita la recogida sencilla de la proteína simplemente recogiendo la leche de la vaca y separando la proteína exógena. En pollos, la producción intensa de anticuerpos en la clara del huevo también proporciona un vehículo atractivo para la expresión y recogida de los anticuerpos. Además, cuando la expresión específica de tejido es específica del oviducto de un pollo, la expresión produce anticuerpos que tienen ciertas propiedades químicas deseables específicas que incrementan la utilidad terapéutica de los anticuerpos al usarlos en el tratamiento de un paciente humano. Así, un campo especialmente atractivo de investigación y desarrollo comercial son los pollos modificados genéticamente que expresan selectivamente anticuerpos en el huevo para facilitar el aislamiento y la recogida de las proteínas con propiedades químicas deseables. Para la producción de anticuerpos exógenos, los sistemas biológicos aviares ofrecen muchas ventajas, que incluyen el cultivo eficaz en granjas, un crecimiento rápido, y una producción económica. Además, el huevo de ave ofrece un diseño biológico ideal, tanto por la síntesis masiva de anticuerpos como por la comodidad de aislamiento y recogida del producto. Además, como se describe más adelante en el contexto de la presente invención, las ventajas del sistema de expresión en pollos transgénicos, en comparación por ejemplo con los sistemas celulares vertebrados, vegetales, o bacterianos, se demuestran fácilmente y se pueden aplicar para producir propiedades químicas excepcionalmente ventajosas para grandes cantidades de producto de anticuerpo. Los científicos han perseguido el objetivo de crear un pollo transgénico durante muchísimos años. Aunque se ha conseguido el objetivo en otras especies, tales como ratones, vacas, y cerdos, no se han creado pollos transgénicos más que por medio del uso de la técnica retroviral, que adolece de limitaciones intrínsecas por el tamaño del transgén que se puede introducir en el ADN del animal transgénico.

Sin embargo, si un cultivo celular fuera lo suficientemente estable como para permitir que se integrasen grandes transgenes en el genoma de la célula, se podría pasar un transgén que codificase una expresión específica de tejido de un anticuerpo a un organismo transgénico mediante varias técnicas diferentes dependiendo de la célula objetivo y de la construcción específica usada como transgén. Se pueden transferir genomas completos mediante hibridación de células, cromosomas intactos mediante microcélulas, segmentos subcromosómicos mediante transferencia génica mediada por cromosomas, y fragmentos de ADN en el intervalo de kilobases mediante transferencia génica mediada por ADN (Klobutcher, L.A. y F.H. Ruddle, *Annu. Rev. Biochem.*, 50: 533-554, 1981). Se pueden transferir cromosomas intactos mediante transferencia de cromosomas mediada por microcélulas (MMCT) (Foumier, R.E. y F.H. Ruddle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74: 319-323, 1977). El diseño específico del transgén también debe considerar el contenido de las secuencias de ADN que codifican el anticuerpo, la línea celular objetivo, el tejido específico en el que se desea la expresión, el organismo hospedador en el que se da la expresión, y el anticuerpo a expresar. El transgén diseñado para la expresión específica de tejido debe satisfacer varios parámetros para posibilitar la integración eficaz en el genoma de una célula y para asegurar la expresión eficaz en el tejido seleccionado del organismo hospedador.

La inserción de los transgenes que posibilitan la expresión específica de tejido puede amenazar la pluripotencia de las células, a menos que se diseñen con cuidado los transgenes y se optimicen las condiciones de cultivo. Así, las líneas celulares adecuadas para el uso en la transgénesis deben ser estables en cultivo y deben mantener la pluripotencia cuando se transfecte la célula con una construcción genética que sea lo suficientemente grande y compleja como para contener todos los elementos necesarios para la expresión específica de tejido y de nivel elevado donde se desee. En el animal transgénico resultante, el transgén se puede expresar opcionalmente de

manera selectiva en los tipos de tejido individuales específicos en los que el transgén está diseñado para expresarse. Dependiendo del contenido genético del transgén, el transgén puede no expresarse en otros tejidos si se compromete la viabilidad del animal o la química ventajosa de la proteína resultante.

5 Esta invención se refiere a técnicas que posibilitan la ingeniería genética de pollos transgénicos y el cultivo a largo
plazo de PGCs usadas para crear pollos transgénicos. También se describen los anticuerpos producidos en pollos y
su química excepcional. De manera específica, estos anticuerpos tienen propiedades químicas ventajosas que
mejoran su utilidad terapéutica en ciertas aplicaciones. Los anticuerpos producidos en pollos tienen un patrón
diferente de modificaciones químicas en comparación con los anticuerpos producidos en sistemas celulares
10 vertebrados, vegetales o bacterianos, de forma que cuando se administran a un paciente con el fin de transportar
una toxina a un tejido objetivo, tal como tumores, el tejido objetivo se trata con una eficacia terapéutica
incrementada. Los cultivos a largo plazo de PGCs se modifican con construcciones genéticas especialmente
diseñadas para introducir modificaciones genéticas en aves, lo que incluye la inserción de transgenes que producen
la expresión específica de tejido de las proteínas exógenas. El ave transgénica puede expresar también el
15 anticuerpo derivado del transgén en el oviducto, y el anticuerpo se deposita en grandes cantidades en el huevo. Las
proteínas de anticuerpos exógenos están codificadas por secuencias de ADN humanas, de forma que se expresan
anticuerpos humanos nativos en el oviducto del pollo y se pueden recoger del huevo.

En la presente memoria se describen poblaciones de aves que exhiben una expresión específica de tejido de
anticuerpos, construcciones de transgenes que posibilitan la expresión de anticuerpos exógenos, composiciones
aisladas de anticuerpos producidos en pollos y que tienen propiedades químicas específicamente definidas. La
20 presente descripción se refiere a métodos para la creación de las aves. La invención usa cultivos de células
primordiales a largo plazo y técnicas especiales para producir pollos quiméricos o transgénicos obtenidos de cultivos
celulares prolongados, en los que el genoma de las PGCs tienen un transgén integrado de manera estable que
expresa una proteína exógena de forma que la progenie de las células cultivadas contiene el transgén integrado de
manera estable. Cuando se introducen en un embrión aviar hospedador, mediante los procedimientos descritos más
25 adelante, esas células donantes modificadas producen aves que expresan el transgén en un tejido somático
seleccionado específico de los animales resultantes.

En la presente memoria se describen composiciones de proteínas exógenas expresadas en los pollos transgénicos y
que tienen ciertas propiedades químicas deseables en comparación con los sistemas celulares vertebrados,
vegetales o bacterianos. De manera específica, estas proteínas, en particular anticuerpos, tienen concentraciones
30 reducidas de fucosa, galactosa, ácido N-acetil neuramínico, ácido N-glicolilneuramínico y concentraciones elevadas
de manosa. Los anticuerpos que tienen algunas o todas estas propiedades exhiben una utilidad terapéutica
incrementada cuando se administran a un ser humano. De manera específica, estas composiciones de anticuerpos
exhiben una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mejorada. Los pollos transgénicos se pueden
usar para mejorar la utilidad terapéutica, basada en el efecto ADCC, de las composiciones de anticuerpos
35 expresándolos en un pollo transgénico.

En la presente memoria se describen pollos transgénicos que expresan anticuerpos exógenos, que tienen la química
ventajosa definida en la presente memoria, en el tejido del oviducto de forma que el anticuerpo exógeno se
concentra en cantidades definidas en la clara del huevo. Preferiblemente, la proteína exógena es un anticuerpo
40 monoclonal de secuencia humana codificado por la construcción de transgén incorporada en el genoma de un ave
transgénica. La secuencia polinucleotídica que codifica el anticuerpo monoclonal humano está contenida dentro de
un transgén que se construye de manera específica para expresarse en el oviducto, y que contiene promotores y
secuencias reguladoras adecuadas para facilitar la expresión específica de tejido.

Esta invención también se refiere a cultivos a largo plazo de células germinales primordiales (PGCs) aviares. Se
describe la creación de un cultivo a largo plazo en el que las PGCs aviares proliferan y en el que los cultivos de PGC
45 se pueden prolongar en múltiples pases para prolongar la viabilidad del cultivo más de 40 días, 60 días, 80 días, 100
días, o más. Las PGCs proliferan en cultivos a largo plazo y producen quimeras de la línea germinal cuando se
inyectan en embriones receptores.

En el sentido más amplio, el alcance de la invención es como se define en las reivindicaciones.

50 Figura 1A: PGCs mantenidas en cultivo durante 54 días. Obsérvese que las células no están adheridas y mantienen
una morfología redondeada. Las flechas indican varias células en división visibles en este cultivo.

Figura 1B. PGCs mantenidas en cultivo durante 234 días. Estas células se cultivan sobre una capa de soporte de
células STO irradiadas.

Figura 2: Expresión génica tal como se determina mediante RT-PCR de los marcadores de células germinales *CVH*
y *Dazl*. Las células estuvieron en cultivo durante 32 días. El carril 1 muestra la expresión de *CVH* y *Dazl* en una
55 alícuota de PGCs. Una segunda muestra, en el carril 2, no tuvo mRNA suficiente tal como se determina por la
ausencia de actina. También se analizaron células cES; Se expresó actina, pero las células cES no expresaron
CVH, y se expresó *Dazl* solamente de manera débil.

Figura 3: Análisis de Western de PGCs mantenidas en cultivo durante 166 días. Se usó testículo como control

positivo e hígado como control negativo. Se usó IgG de conejo anti-CVH de pollo como anticuerpo primario.

Figura 4: Ensayo mediante protocolo de amplificación de repeticiones teloméricas (TRAP). Se mantuvieron en cultivo diferentes diluciones de extractos celulares de 2 líneas celulares de PGC diferentes (13&16) durante 146 días. El control positivo consistió en la línea celular 293 de riñón humano transformada, y el control negativo fue tampón de lisis solamente, sin molde añadido. En los carriles de PGC y de control positivo, son visibles las secuencias repetitivas, lo que indica la presencia de telomerasa.

Figura 5A: Células cEG obtenidas de PGCs mantenidas en cultivo. 5B: Células madre embrionarias de pollo. Obsérvense las células pequeñas, con núcleo grande (gris claro) y nucleolo pronunciado en ambos tipos de células.

Figura 6: Quimeras obtenidas de células cEG obtenidas de PGCs. Las células EG se obtuvieron de embriones de raza Barred Rock con plumaje negro. Como receptor, se usó un embrión con plumaje blanco (raza livornesa blanca). Es evidente un quimerismo somático por las plumas negras.

Figura 7: Gallo IV7-5 con su descendencia. Un ejemplar de raza livornesa blanca es homocigoto dominante en el locus blanco dominante (*I/I*). Cuando se cruza con una gallina de raza Barred Rock (*i/i*) toda la descendencia de un ejemplar de raza livornesa será blanca (*I/i*). Un polluelo negro demuestra que las PGCs inyectadas (obtenidas de un embrión de raza Barred Rock (*i/i*)) se han introducido en la línea germinal del gallo de raza livornesa blanca.

Figura 8: Análisis de Southern del transgén *cx-neo* en una línea de células germinales primordiales (PGCs).

Figura 9: Análisis de FACS de células DT40 (población de control negativo), células ES, células EG y PGCs, teñidas con anticuerpos hacia el homólogo de Vasa de pollo (CVH) y 1B3. Las células DT40, ES y EG fueron negativas para ambos marcadores, mientras una gran mayoría de PGCs se tiñeron para CVH y 1B3. Las líneas celulares usadas fueron PGC 102; ES 439 y EG 455.

Figura 10: Análisis de Southern del transgén *HS4-β-actina-neo* en 2 líneas de células germinales primordiales, PGCs.

Figura 11: Análisis mediante transferencia de Southern que muestra que una línea PGC transfectada, obtenida de manera clonal, puede contribuir a la línea germinal en pollos quiméricos y diferenciarse hasta células EG. Panel superior: Los ADNs genómicos de PGCs transfectadas con la construcción *HS4 β-actina-eGFP-β-actina-puro*, tres embriones obtenidos a partir de un gallo quimérico producido con las PGCs transfectadas y células EG obtenidas de las PGCs transfectadas, se digirieron con enzimas de restricción para detectar fragmentos internos (*KpnI*) y fragmentos de unión (*NcoI*, *AflII*) de la inserción del transgén. El ADN digerido se separó en un gel de agarosa del 0,7%, se transfirió a una membrana de nailon, y se analizó con sondas de secuencias de eGFP radiomarcadas. Los tamaños de los fragmentos que hibridaron fueron idénticos en las PGCs, células EG, y dos embriones que mostraron fluorescencia verde (embriones GFP+). Un tercer embrión sin fluorescencia (embrión T.N.) no mostró hibridación. Panel inferior: se muestra un esquema de la construcción, con las localizaciones de los sitios de restricción indicados, y más adelante se muestran los tamaños esperados de los fragmentos de restricción. Hay dos sitios *KpnI*, que dan como resultado un fragmento de 5,3 kb. *NcoI* y *AflII* cortan una vez dentro de la construcción, y por lo tanto los fragmentos de restricción observados son fragmentos de unión que unen la construcción con el ADN genómico flanqueante en el sitio de inserción.

Figura 12: Cariotipo de G-09 que muestra que todos los cromosomas son diploides. En una copia de GGA 2, la mayoría del brazo p no existe o está translocado en otro cromosoma. La otra copia de CGA 2 es normal. Las células son ZZ (macho).

Figura 13: Corte de testículos, a los 18 días del desarrollo, teñido con DAPI. Las células germinales positivas para GFP son claramente visibles dentro de los túbulos seminíferos.

Figura 14: El panel teñido con DAPI muestra un corte a través de un túbulo seminífero de un testículo en E18.

Figura 15: Descendencia transgénica de una quimera que porta PGCs que se han transfectado de manera estable con un transgén de *βactina-GFP*. Los embriones demuestran que se expresa GFP en todos los tejidos de la Etapa X (EG&K) a la Etapa 34 (H&H).

Figura 16: En la etapa 1, se inserta el casete IgL/IgH anti-IL-2Rα en el Ov BAC mediante recombinación homóloga en *E. coli* mediante ingeniería de recombinación. El anticuerpo está entonces bajo control transcripcional de los elementos reguladores Ov. En la etapa 2, se elimina el gen de kanamicina usado en la ingeniería de recombinación mediante la Flp recombinasa.

La Figura 17 muestra el diseño de los oligos del gen V de la cadena ligera diseñados para hibridar entre sí para producir la región V de la cadena ligera de longitud completa tal como se muestra. Se muestra cada oligo con la punta de la flecha en la dirección 3'.

La Figura 18 muestra la construcción OvBAC con 110 kb de secuencia de 5' del gen estructural Ov, y 30 kb de secuencia flanqueante de 3' del gen estructural Ov.

- 5 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión células madre embrionarias de pollo (cES) significa células que exhiben una morfología de células ES y que contribuyen al tejido somático en un embrión receptor derivado del área pelúcida de embriones en Etapa X (E-G&K) (el equivalente aproximado del blastocisto de ratón). Las células cES comparten varias características *in vitro* de las células ES de ratón, tales como ser SSEA-1+, EMA-1+ y telomerasa+. Las células ES tienen la capacidad de colonizar todos los tejidos somáticos.
- 10 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión células germinales primordiales (PGCs) significa células que exhiben una morfología de PGC y que contribuyen exclusivamente a la línea germinal en los embriones receptores, y las PGCs pueden proceder de sangre completa obtenida de embriones en Etapa 12 - 17 (H&H). Se puede establecer un fenotipo de PGC porque (1) los genes específicos de la línea germinal CVH y Dazl se transcriben intensamente en esta línea celular, (2) las células expresan intensamente la proteína CVH, (3) las células no contribuyen a los tejidos somáticos cuando se inyectan en un embrión receptor en Etapa X ni en Etapa 12-17 (H&H), (4) las células dan lugar a células EG (véase más adelante), o (5) las células transmiten el genotipo PGC por medio de la línea germinal cuando se inyectan en embriones en Etapa 12-17 (H&H) (Tajima et al. (1993) *Theriogenology* 40, 509-519; Naito et al., (1994) *Mol. Reprod. Dev.*, 39,153-161; Naito et al., (1999) *J. Reprod. Fert.* 117, 291-298).
- 15 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión células germinales embrionarias de pollo (cEG) significa células derivadas de PGCs y que son análogas en su función a las células EG murinas. La morfología de las células cEG es similar a la de las células cES, y las células cEG contribuyen a los tejidos somáticos cuando se inyectan en un receptor en Etapa X (E-G&K).
- 20 Tal como se usa en la presente memoria, el término transgénico significa un animal que codifica un transgén en sus células somáticas y germinales, y que es capaz de pasar los rasgos transgénicos a su progenie.
- Aunque los ejemplos de la presente memoria se describen para pollos, los pollos se pueden sustituir por otras especies gallináceas tales como codornices, pavos, faisanes y otras en la experimentación, y con una expectativa razonable de una puesta en práctica con éxito de los métodos descritos en la presente memoria.
- 25 Mediante la inserción de construcciones de ADN diseñadas para la expresión específica de tejido en células ES en cultivo se han creado pollos que expresan productos farmacéuticos valiosos, tales como anticuerpos monoclonales, en las claras de sus huevos. Véase el documento WO 04/015123 de Zhu et al. Una técnica propicia crucial para tales animales es la creación y el mantenimiento de cultivos de células ES realmente a largo plazo que permanezcan viables durante el tiempo suficiente para que se modifique el genotipo de las células clonadas en cultivo.
- 30 A diferencia de las células ES, sin embargo, las células germinales primordiales (PGCs) solamente se han cultivado a corto plazo. Una vez que el periodo en cultivo se prolonga más allá de unos pocos días, estas células pierden la capacidad de contribuir exclusivamente a la línea germinal. En general, las PGCs mantenidas en cultivo mediante el uso de las técnicas de cultivo actuales no proliferan y se multiplican. Sin un crecimiento intenso, los cultivos son "terminales" y no se pueden mantener de manera indefinida. Con el tiempo, estos cultivos de células terminales se degradan y las células pierden su morfología exclusiva de PGC y revierten a células EG. Las células germinales embrionarias adquieren una morfología diferente de las PGCs, pierden su limitación a la línea germinal, y adquieren la capacidad de contribuir a los tejidos somáticos al inyectarlas en etapas tempranas del desarrollo embrionario.
- 35 Para introducir un genotipo predeterminado en la línea germinal de un embrión receptor, y de ese modo posibilitar que el animal pase el genotipo deseado a generaciones futuras, las PGCs son excepcionalmente atractivas porque se sabe que son los progenitores del esperma y los huevos.
- 40 Los cultivos a largo plazo de PGCs proporcionan varias ventajas importantes, tales como el mantenimiento de las características genéticas valiosas de líneas de cría de pollos importantes de las que dependen las industrias de producción de aves de corral y huevos. En la actualidad se toman medidas extraordinarias para prevenir la pérdida de líneas de cría valiosas por accidente o enfermedad. Estas medidas requieren mantener un gran número de miembros de una línea como reserva de cría y duplicar estas reservas en múltiples localizaciones en todo el mundo.
- 45 El mantenimiento de un gran número de animales valiosos en reserva es necesario, ya que también es importante preservar la diversidad genética dentro de una línea de cría. Mediante la preservación de estas características genéticas en cultivos de células PGC, se evita el coste de poblaciones de cría de reserva a gran escala.
- 50 Los cultivos a largo plazo de PGCs también son muy valiosos para la producción de productos farmacéuticos a partir de los huevos de pollos modificados genéticamente. La producción de pollos modificados genéticamente mediante el uso de PGCs requiere introducir modificaciones genéticas en el genotipo de las PGCs mientras se mantienen en cultivo. Se conocen bien las técnicas para una amplia diversidad de manipulaciones genéticas de células objetivo en cultivo. Sin embargo, una dificultad importante es que para alterar el genotipo de las PGCs en cultivo, el cultivo debe permanecer viable durante un tiempo adecuado para introducir las modificaciones genéticas y para seleccionar con éxito las células transformadas, y mientras las células transfectadas crecen y proliferan en cultivo. Las células transformadas con éxito que son capaces de proliferar se distinguen por su capacidad de generar un gran número de células (p.ej., 10^4 a 10^7 células) en varios días a varias semanas tras la obtención clonal o prácticamente clonal. Las células fundadoras serán las escasas células que porten la modificación genética que se desea. En general, estas células se generan en cultivo a frecuencias de 10^{-4} a 10^{-7} tras la aplicación de técnicas de modificación genética que son muy conocidas, (p.ej. lipofección o electroporación). Por lo tanto, la producción de células en
- 55

cultivo requiere hacer un pase de las células para proporcionar espacio y nutrientes para que las células proliferen y generen un número suficiente de células para permitir la selección de las escasas células modificadas genéticamente en cultivo.

5 Además, las condiciones de cultivo deben ser lo suficientemente robustas como para permitir que las células crezcan a partir de una célula individual modificada genéticamente hasta una colonia de 10^4 a 10^7 células a usar para el análisis genético *in vitro* y para la producción de quimeras. Así, si la duración del cultivo se pudiera prolongar a la vez que se conserva el genotipo y el fenotipo de las células como PGCs verdaderas, las células se podrían modificar e introducir en los embriones receptores en un punto del desarrollo embrionario en el que las células competentes de la línea germinal están migrando hacia la gónada. Estas PGCs modificadas contribuirían exclusivamente a la población naciente de espermatogonias u ovogonias (es decir, el esperma y los huevos) de los animales resultantes tras la madurez. En tal animal resultante, la totalidad del tejido somático procedería del embrión receptor y la línea germinal contendría contribuciones de las células donantes y de los embriones receptores. Debido a la contribución mixta a la línea germinal, estos animales se conocen como "quimeras de la línea germinal". Dependiendo del grado de quimerismo, la descendencia de las quimeras de la línea germinal procederá de la célula donante o del embrión receptor.

La línea germinal en pollos se inicia a medida que las células del epiblasto de un embrión en Etapa X (E-G & K) acceden al hipoblasto naciente (Kagami et al., (1997) Mol Reprod Dev 48, 501-510; Petite, (2002) J Poultry Sci 39, 205-228). A medida que el hipoblasto se desarrolla en posición anterior, las células germinales preprimordiales se desplazan hacia la creciente germinal en la que se pueden identificar como grandes células cargadas de glucógeno. La identificación más temprana de las células de la línea germinal mediante estos criterios morfológicos es aproximadamente 8 horas tras el comienzo de la incubación (Etapa 4 mediante el uso del sistema de identificación de etapas establecido por Hamburger y Hamilton, (1951) J Morph 88, 49-92). Las células germinales primordiales residen en la creciente germinal desde la Etapa 4 (H&H) hasta que migran a través de la vasculatura durante la Etapa 12-17 (H&H). En este momento, las células germinales primordiales son una pequeña población de alrededor de 200 células. Desde la vasculatura, las células germinales primordiales migran hacia la cresta genital y se incorporan al ovario o los testículos a medida que las gónadas se diferencian (Swift, (1914) Am. J. Anat. 15, 483 - 516; Meyer, (1964) Dev Biol. 10, 154-190; Fujimoto et al. (1976) Anat. Rec. 185, 139 - 154).

En todas las especies que se han examinado hasta la fecha, las células germinales primordiales no han proliferado en cultivo durante periodos largos sin diferenciarse hasta células EG. Son necesarios periodos largos en cultivo para producir un número suficiente de células para introducir una modificación genética mediante protocolos convencionales de electroporación o lipofección. En general, estos protocolos requieren de 10^5 a 10^7 células y, por lo tanto, la producción de estas células a partir de un único precursor requiere de 17 a 24 duplicaciones suponiendo que todas las divisiones celulares son (1) sincronizadas y (2) producen dos células hijas viables. La introducción de una modificación genética en el genoma de una célula es un suceso poco frecuente, que se da en general en una de 1×10^4 a 1×10^6 células. Tras la modificación genética, las células deben ser capaces de establecer una colonia a partir de la única célula que porta y/o expresa la modificación genética. La colonia debe ser capaz de expandirse hasta una población de 10^5 a 10^7 células que se pueden analizar mediante PCR o análisis de Southern para determinar la fidelidad del transgén y proporcionar un número suficiente de células que se inyectan después en embriones receptores en Etapa 13-15 (H&H). Por lo tanto, son necesarias otras 17 a 24 divisiones celulares para producir las poblaciones de células, y en total son necesarias de 34 a 58 duplicaciones para producir la población de células modificadas genéticamente. Suponiendo que el ciclo celular sea de 24 horas, es necesario un mínimo de 34 días y en general 58 días en cultivo para producir células germinales primordiales modificadas genéticamente para la inyección en embriones receptores en Etapa 13-15 (H&H). Las células inyectadas después deben ser capaces de colonizar la línea germinal, formar gametos funcionales y desarrollarse hasta un nuevo individuo tras la fertilización.

Se ha informado de varios intentos de establecer líneas celulares para cultivo a largo plazo de PGCs de pollo, pero ninguno de estos intentos ha producido una línea de células que se pueda mantener. En cada uno de estos casos, el cultivo de PGCs se ha diferenciado hasta células EG, véanse los documentos WO02/067669, WO 00/47717; WO99/06533; WO99/06534; Park et al., (2003) Mol. Reprod. Dev. 65, 389-395; Park y Han, (2000) Mol. Reprod. Dev. 56, 475-482, o células con un fenotipo de células ES, véase el documento WO 01/11019. En otros casos, los cultivos de PGC se pudieron mantener durante solamente 5 días (Chang et al., (1997) Cell Biology International 21, 495-499; Chang et al., (1995) Cell Biology International 19, 569 - 576) o 10 días (Park et al., (2003) Biol. Reprod. 68, 1657 - 1662). Hong et al. (Transgenic Research, 1998, vol. 7, págs. 247-252) han transfectado PGCs de embriones de pollo de 6 días y mostraron una migración exclusivamente hacia las gónadas. No se demuestra una transmisión en la línea germinal. En otro caso, se mantuvieron PGCs en cultivo durante 2 meses, pero las células proliferaron solo muy lentamente, y el cultivo no se pudo someter a pases (Han et al., (2002) Theriogenology 58, 1531-1539). La capacidad de someter a pases a un cultivo de PGC es una propiedad crucial de un cultivo a largo plazo usado para la modificación genética de PGCs y para la mayoría de técnicas valiosas agrícolas y de cría.

La capacidad de los cultivos de células PGC de proliferar es esencial para la selección de las células cuyo genoma se ha alterado mediante integración aleatoria de un transgén o mediante modificación específica de sitio. En ambos tipos de modificación genética, la proporción de células que adquieren la modificación genética en forma de una integración estable en el genoma de la célula en cultivo es muy baja, del orden de una célula entre diez mil y cien millones (es decir, 1×10^{-4} a 1×10^{-8}). Por lo tanto, la capacidad de establecer un cultivo que crezca rápidamente es

necesaria para obtener una población adecuada de células procedentes del suceso poco frecuente que crea la modificación genética en el genoma de una célula en cultivo.

5 Se han modificado genéticamente células germinales primordiales de pollo mediante el uso de un vector retroviral en unas cuantas horas tras el aislamiento a partir de embriones en Etapa 11-15 (Vick et al., (1993) Proc. R. Soc. Lond. B 251, 179 - 182). Sin embargo, el tamaño del transgén está limitado en general a menos de alrededor de 15 kb, normalmente menos de 10 kb, y lo más habitualmente menos de 8 kb, y no se pueden crear cambios específicos de sitio en el genoma mediante el uso de esta técnica. No se ha informado previamente de modificaciones genéticas estables que requieran la inserción de más de 15 kb de ADN exógeno en el genoma de PGCs aviares cultivadas.

10 Cualquier limitación del tamaño de un transgén de ADN exógeno que se pueda introducir de manera estable en un cultivo de células PGC a largo plazo es una limitación crucial sobre la capacidad de llevar a cabo modificaciones genéticas valiosas en el genoma de PGCs en cultivo, y, a su vez, limita los tipos de modificaciones genéticas que se pueden hacer pasar a través de la línea germinal a la descendencia del embrión receptor. Por ejemplo, la introducción de ADN exógeno que codifica una proteína en el genoma de un pollo transgénico es una modificación genética muy deseable. Si se pudiera crear una población de tales pollos transgénicos, se podrían expresar grandes cantidades de proteínas valiosas en el pollo y recogerlas en el huevo. El huevo aviar ofrece un depósito ideal para las proteínas biológicamente activas, y proporciona un entorno adecuado a partir del cual se pueden aislar las proteínas. Las aves también son candidatos atractivos para una amplia diversidad de técnicas transgénicas. Sin embargo, la aplicación de toda la gama de técnicas transgénicas de mamíferos a especies aviares ha sido infructuosa debido a la ausencia de una población de células cultivadas en la que se puedan introducir modificaciones genéticas y transmitir las a la línea germinal. En un artículo reciente, Sang et al. indica: "Es poco probable que las PGCs se puedan mantener en cultivo y que proliferen durante el periodo prolongado necesario para identificar sucesos de selección de genes sin que pierdan la capacidad de migrar hacia la gónada en desarrollo tras la transferencia". Prospects for Transgenesis in the Chick, Mechanisms of Development, 121, 1179-1186, (2004). Por lo tanto, hasta la fecha, no se han creado PGCs transfectadas genéticamente, y no se ha demostrado la transmisión a un animal vivo maduro de una modificación genética introducida en una PGC aviar.

15 Las células germinales primordiales (PGCs) son los precursores del esperma y los óvulos, y se segregan de los tejidos somáticos en una etapa temprana del desarrollo en la mayoría de los animales. De acuerdo con esta invención, se aíslan, cultivan y modifican genéticamente PGCs de pollo mientras se mantiene su vinculación con la línea germinal. Además, se induce a las PGCs a diferenciarse hasta células germinales embrionarias (EGCs), que se parecen a las células madre embrionarias de pollo (ESCs) por su vinculación con los tejidos somáticos. Estas PGCs se vinculan con los tejidos somáticos y la línea germinal y proporcionan un recurso excepcional para la modificación genética del genoma en pollos.

20 Las PGCs mantenidas en el cultivo descrito en la presente memoria mantienen una morfología de PGC característica mientras se mantienen en cultivo. La morfología de PGC se puede observar mediante observación directa, y se estudia el crecimiento de las células en cultivo mediante las técnicas habituales para asegurar que las células proliferan en el cultivo. Los cultivos celulares que proliferan se definen como no terminales, y se observa que tienen un mayor número de células en cultivo en el último de 2 momentos diferentes. Las PGCs en el cultivo de la invención pueden tener 1×10^5 o más células en cualquier cultivo particular, y se puede observar que este número se incrementa a lo largo del tiempo. Por lo tanto, la descripción incluye un cultivo de PGC en proliferación que contiene un número mayor de células después de un periodo de días, semanas, o meses en comparación con un momento anterior en la vida del cultivo. De forma ideal, el cultivo contiene al menos 1×10^5 células, y se puede observar que tiene un número mayor después de cualquier periodo de tiempo creciendo en cultivo. Además, se puede observar que las PGCs son la especie dominante en el cultivo, de forma que, cuando se considera la contribución mínima hecha por las células de soporte que no son de pollo, el componente en proliferación del cultivo celular consiste básicamente en células germinales primordiales de pollo, con la exclusión sustancial de otras células derivadas de pollo.

25 El cultivo también manifiesta la característica de permitir la proliferación por pase, de forma que se pueden separar muestras o alícuotas de células de un cultivo existente, y exhibirán un crecimiento intenso al colocarlas en medios de cultivo nuevos. Por definición, la capacidad de realizar un pase de un cultivo celular indica que el cultivo celular está creciendo y proliferando, y que no es terminal. Además, las células descritas en la presente memoria muestran la capacidad de crear quimeras de la línea germinal después de varios pases y mantener una morfología de PGC. Como se describe en la presente memoria, esta proliferación es una característica esencial de cualquier cultivo celular adecuado para la integración estable de secuencias de ADN exógenas.

30 Las PGCs se pueden obtener mediante cualquier técnica conocida y cultivarlas en las condiciones de cultivo descritas en la presente memoria. Sin embargo, se prefiere extraer sangre completa de un embrión en etapa 15 y colocarla directamente en los medios de cultivo descritos más adelante. Esta aproximación difiere de otras aproximaciones descritas en la bibliografía, en las que las PGCs se someten a etapas de procesamiento y separación antes de colocarlas en cultivo. A diferencia de las técnicas de cultivo convencionales, el cultivo y la metodología de la presente invención se basan en el crecimiento diferencial intenso entre las PGCs y otras células de la sangre completa que pueden coexistir inicialmente en el medio, para proporcionar las grandes poblaciones de PGCs en cultivo descritas en la presente memoria. Por lo tanto, la presente descripción proporciona el cultivo de

PGCs obtenidas directamente de sangre completa que crecen en grandes concentraciones de células en cultivo, que pueden someterse a un número ilimitado de pases, y que exhiben un crecimiento y proliferación intensas, de forma que las PGCs en cultivo son básicamente las únicas células que crecen y proliferan. Estas condiciones de cultivo proporcionan una ventaja importante, y de ese modo hacen que la recogida, el almacenamiento, y el mantenimiento de las PGCs en cultivo sea especialmente simple y eficaz, y proporciona una fuente fácilmente disponible de células donantes para crear quimeras de la línea germinal que pasan el genotipo de las células PGC cultivadas a la descendencia.

Las PGCs mantenidas en cultivo por los inventores han mostrado la existencia de un cultivo no terminal, y han existido hasta la actualidad durante al menos 327 días en cultivo. Estas células están creciendo y proliferando de la misma manera que se observó a los 40, 60, 80, o 100 días (y todos los valores enteros entre medias), y las células siguen contribuyendo a las quimeras de la línea germinal como se describe más adelante, y, así, exhiben las características distintivas primarias de las PGCs verdaderas, es decir, la contribución exclusiva a la línea germinal cuando se introducen en un embrión receptor. La metodología de cultivo tal como se describe incluye usar sangre completa, que contiene eritrocitos y otros tipos de células metabólicamente activas, colocar una mezcla de células en cultivo junto con células germinales primordiales y permitir que el cultivo se desarrolle para que consista básicamente en PGCs aviares que expresan las características de cultivo a largo plazo descritas en la presente memoria. La técnica de cultivo celular descrita en la presente memoria evita cualquier proceso o técnica de separación de células, y se basa únicamente en las condiciones de crecimiento diferencial para producir la predominancia de las PGCs en cultivo. El uso de sangre completa como fuente de las células PGC establecidas y cultivadas ofrece ventajas prácticas en la eficacia y utilidad del establecimiento de los cultivos y el uso de las células para propósitos agrícolas o transgénicos. Por lo tanto, en un aspecto de la invención, el medio de cultivo se acondiciona con BRL (células de hígado de rata Buffalo), contiene factores de crecimiento de fibroblastos, factor de células madre, y suero de pollo. Las características particulares del medio se describen con más detalle más adelante.

En un aspecto, se establece un cultivo que tiene un gran número de PGCs que son genéticamente idénticas y que proliferan para producir un cultivo celular a largo plazo. Estas PGCs se pueden usar repetidamente para crear quimeras de la línea germinal introduciendo las PGCs de un cultivo a largo plazo en proliferación en los embriones receptores. En los intentos previos de uso de PGCs para crear quimeras de la línea germinal, se limitó intrínsecamente el número de quimeras que se pudieron crear por la incapacidad de desarrollar cultivos a largo plazo de PGCs verdaderas que conservasen el fenotipo de PGC. Debido a que la presente descripción posibilita los cultivos a largo plazo, se puede crear cualquier número de quimeras de la línea germinal a partir del mismo cultivo celular, y se puede establecer una población completa de quimeras de la línea germinal que tienen líneas germinales genéticamente idénticas, derivadas de PGC. En un aspecto, se puede crear un gran número, que incluye más de 3, más de 4, más de 5, 10, 15 y 20 animales quiméricos de la línea germinal que tienen todas las células derivadas de PGC genéticamente idénticas en su línea germinal. Un aspecto es la creación de una población de quimeras de la línea germinal que tienen en general células derivadas de PGC idénticas en su línea germinal que tienen, en la población, diferenciales de edad que reflejan el uso del mismo cultivo celular a largo plazo para crear las quimeras de la línea germinal. Los diferenciales de edad superan la capacidad disponible actualmente de cultivar células germinales primordiales a lo largo del tiempo, y son de hasta 190 días sin congelación. Dos o más quimeras de la línea germinal tienen células derivadas de PGC idénticas en su línea germinal que difieren en edad en más de 40 días, 60 días, 80 días, 100 días, 190 días, etc., o puede existir cualquier otro valor entero entre medias, sin congelar las células. Pueden existir quimeras de la línea germinal sexualmente maduras que tengan células derivadas de PGC genéticamente idénticas en su línea germinal, ya que se usó un cultivo de PGC no terminal para crear estas quimeras de la línea germinal, y a partir del cual se pueden crear quimeras adicionales de la línea germinal.

Debido a que las PGCs se pueden mantener en cultivo de una manera que es extremadamente estable, las células también se pueden crioconservar y descongelar para crear una metodología de almacenamiento a largo plazo para crear quimeras de la línea germinal que tienen la capacidad de producir una descendencia definida por el fenotipo de las PGCs mantenidas en el cultivo.

La capacidad de producir un gran número de quimeras de la línea germinal también proporciona la capacidad de pasar el genotipo derivado de las PGCs a la descendencia de la quimera de la línea germinal, lo que da como resultado poblaciones de quimeras de la línea germinal que tienen células derivadas de las PGCs genéticamente idénticas en la línea germinal, y también a la descendencia de las quimeras de la línea germinal cuyo genotipo y fenotipo se determina completamente por el genotipo de las PGCs expandidas en cultivo. La transmisión de un fenotipo derivado de PGC a través de la línea germinal se ha observado para más de 20 aves en porcentajes de transmisión de hasta un 86%. Así, se puede crear una descendencia de una quimera de la línea germinal mediante la transmisión por la línea germinal de un genotipo de una célula germinal primordial mantenida en cultivo. Así, puede existir un cultivo de células germinales primordiales que contiene PGCs de un fenotipo definido, una quimera de la línea germinal que tiene la misma célula germinal primordial como parte de su línea germinal, y una descendencia de la quimera de la línea germinal que tiene un genotipo y fenotipo dictado por las PGCs del cultivo.

Como se ha descrito previamente, la existencia de cultivos de PGC a largo plazo posibilita la capacidad de transfectar de manera estable las células en cultivo con ADN que codifica proteínas exógenas o introducir otras manipulaciones genéticas deseables, tales como inserciones de genes e inactivaciones de genes de un animal

transgénico. Por lo tanto, todas las poblaciones anteriormente descritas de PGCs en cultivo, las quimeras de la línea germinal, y la descendencia de las quimeras de la línea germinal también pueden comprender una construcción de ADN integrada de manera estable en el genoma de la célula germinal primordial, transmitida en la línea germinal de la quimera de la línea germinal, y transmitida a futuras generaciones que constituyen la descendencia de las quimeras de la línea germinal.

La célula germinal primordial puede contener prácticamente cualquier construcción genética modificada, y se puede usar para introducir modificaciones genéticas en aves que superan la limitación de tamaño actualmente impuesta por las técnicas retrovirales, lo que incluye las modificaciones específicas de sitio en el genoma y/o la inserción de transgenes que codifican proteínas exógenas de longitud completa, tales como anticuerpos monoclonales. Los pollos modificados genéticamente pueden expresar proteínas exógenas de una manera específica de tejido en el oviducto para expresar las proteínas exógenas en el huevo.

Los cultivos de PGC tal como se describen son lo suficientemente estables como para permitir que un transgén se integre de manera estable en el genoma de la PGC, para aislar las células genéticamente modificadas de las células sin modificar en el cultivo, y para introducir las células modificadas en un embrión receptor, a la vez que se mantiene la capacidad de las PGCs cultivadas de contribuir a la línea germinal en la quimera resultante. En los casos en los que la expresión del transgén se controla mediante un promotor específico de tejido, el transgén no se expresaría en las PGCs. En estos casos, el transgén se expresaría en los tejidos seleccionados en la descendencia transgénica de la quimera de la línea germinal. Se pueden transferir genomas completos mediante hibridación de células, cromosomas intactos mediante microcélulas, segmentos subcromosómicos mediante transferencia génica mediada por cromosomas, y fragmentos de ADN en el intervalo de kilobases mediante transferencia génica mediada por ADN (Klobutcher, L.A. y F.H. Ruddle, *Ann. Rev. Biochem.*, 50: 533-554, 1981). Se pueden transferir cromosomas intactos mediante transferencia de cromosomas mediada por microcélulas (MMCT) (Fournier, R.E. y Ruddle, F.H., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 74: 319-323, 1977).

Los cultivos estables a largo plazo de PGCs que producen pollos modificados genéticamente son necesarios para varias aplicaciones en transgénesis aviar, que incluyen la producción de proteínas para la industria farmacéutica, la producción de pollos que depositan anticuerpos monoclonales humanos en sus huevos, y para hacer cambios específicos de sitio en el genoma aviar para otras diversas aplicaciones, que incluyen los anticuerpos policlonales de secuencias humanas.

La proporción de PGCs derivadas del donante y derivadas del receptor en un embrión receptor se puede alterar para favorecer la colonización de la línea germinal en las quimeras derivadas de PGCs. En los embriones de pollo y codorniz en desarrollo, la exposición a busulfán reduce enormemente o elimina la población de células germinales primordiales a medida que migran desde la cresta germinal a la cresta gonadal (Reynaud (1977a) *Bull. Soc. Zool. Francaise* 102,417-429; Reynaud (1981) *Arch. Anat. Micro. Morph. Exp.* 70, 251 - 258; Aige-Gil y Simkiss (1991) *Res. Vet. Sci.* 50, 139 - 144). Cuando se inyecta busulfán en la yema después de 24 a 30 horas de incubación y se reintroducen las células germinales primordiales en la vasculatura después de 50 a 55 horas de incubación, la línea germinal se repuebla con las células germinales primordiales derivadas del donante y, posteriormente, se producen gametos derivados del donante (Vick et al. (1993) *J. Reprod. Fert.* 98, 637 - 641; Bresler et al. (1994) *Brit. Poultry Sci.* 35 241 - 247).

Los métodos de la invención son como se definen en las reivindicaciones, e incluyen: obtener PGCs de un pollo, tal como de la sangre completa de un embrión en etapa 15, colocar las PGCs en cultivo, hacer proliferar las PGCs para incrementar su número y posibilitar la realización de varios pases, crear quimeras de la línea germinal a partir de estos cultivos celulares a largo plazo, y obtener una descendencia de las quimeras de la línea germinal que tienen un genotipo proporcionado por las PGCs cultivadas. Los métodos también incluyen insertar modificaciones genéticas en una población de PGCs en cultivo para crear PGCs transfectadas de manera estable, seleccionar las células de esta población que portan transgenes integrados de manera estable, inyectar las células modificadas genéticamente que portan los transgenes integrados de manera estable en un embrión receptor, desarrollar el embrión hasta una quimera de la línea germinal que contiene la modificación genética en la línea germinal, criar la quimera de la línea germinal hasta la madurez sexual y cruzar la quimera de la línea germinal para obtener una descendencia transgénica en la que la modificación genética deriva de la PGC cultivada.

Lo siguiente describe el hallazgo inesperado de que las PGCs se pueden aislar de la sangre de embriones en Etapa 12-17 (H&H), que las células proliferarán rápidamente y mantendrán su fenotipo de PGC, que las PGCs se pueden someter a pases diarios o a intervalos de 2 días o 3 días, que las PGCs colonizarán la línea germinal pero no los tejidos somáticos después de al menos 110 días en cultivo, que se puede obtener una descendencia viable de células que han estado en cultivo durante 110 días, que las PGCs se pueden modificar genéticamente mediante transfección con un transgén, y que las PGCs modificadas genéticamente se pueden aislar y propagar hasta una colonia de PGCs modificadas genéticamente.

Se han obtenido líneas celulares de PGC de pollo a partir de sangre tomada de embriones en Etapa 14-16 (H&H) que tienen una morfología grande y redondeada (Figura 1). Se confirmó que estas células son PGCs de pollo por su morfología tras el cultivo a largo plazo y su capacidad de producir una descendencia derivada de las PGCs. Además, los cultivos de PGCs expresan los genes específicos de la línea germinal *Dazl* y *CVH* (Figura 2), y las células en

cultivo producen la proteína CVH (Figura 3). Las PGCs en cultivo también expresan telomerasa (Figura 4), lo que indica que tienen un fenotipo inmortal. Además, las PGCs darán lugar a células germinales embrionarias (EG) en las condiciones adecuadas de cultivo (Figura 5). Por analogía, las PGCs de ratón y humanas darán lugar a células EG cuando se traten de forma análoga. Las células EG de ratón contribuirán a los tejidos somáticos, y las células EG de pollo también contribuyen a los tejidos somáticos, tal como se indica por la pigmentación negra de las plumas en las quimeras (Figura 6). Las PGCs de pollo se han modificado genéticamente tal como se indica mediante análisis de Southern (Figura 7). En esta realización, se integra de manera estable el promotor CX en el genoma de una PGC y se usa para facilitar la expresión del gen que codifica la aminoglicósido fosfotransferasa (APH), que también se integra en el genoma de una PGC y se usa para conferir resistencia a la neomicina añadida a los medios de cultivo para seleccionar las PGCs que se han modificado genéticamente.

Ejemplo 1. Obtención de cultivos de PGCs de pollo

Se incubaron de dos a cinco μL de sangre tomada del seno terminal de embriones en Etapa 14 - 17 (H&H) en placas de 96 pocillos en un medio que contenía factor de células madre (SCF; 6 ng/ml o 60 ng/ml), factor de crecimiento de fibroblastos recombinante humano (hrFGF; 4 ng/ml o 40 ng/ml), 10% de suero bovino fetal, y 80% de medio acondicionado KO-DMEM. Preferiblemente, se tomaron de uno a tres μL de la vasculatura de un embrión en etapa 15-16 (H&H). Los pocillos de las placas de 96 pocillos se sembraron con células STO irradiadas a una concentración de 3×10^4 células/cm².

Se prepararon medios acondicionados KO-DMEM cultivando células BRL hasta la confluencia en DMEM complementado con un 10% de suero bovino fetal, 1% de pen./estrep.; glutamina 2 mM, piruvato 1 mM, nucleósidos 1X, aminoácidos no esenciales 1X y β -mercaptoetanol 0,1 mM y que contenía un 5% de suero bovino fetal durante tres días. Después de 24 h, se retiró el medio y se acondicionó un lote nuevo de medio durante tres días. Esto se repitió una tercera vez y los tres lotes se combinaron para producir el medio de cultivo de PGCs.

Después de aproximadamente 180 días en cultivo, se cultivó una línea de PGCs en medios compuestos de un 40% de medios acondicionados KO-DMEM, 7,5% de suero bovino fetal y 2,5% de suero de pollo. En estas condiciones, el tiempo de duplicación de las PGCs fue de aproximadamente 24-36 horas.

Cuando se inició el cultivo, el tipo de células predominante fueron los eritrocitos fetales. En tres semanas, el tipo de células predominante fue el de una PGC. Se obtuvieron dos líneas celulares de PGCs a partir de 18 cultivos que se iniciaron de embriones individuales.

Una línea de PGCs ha estado en cultivo durante más de 9 meses, mantiene una morfología redondeada, y sigue sin adherirse (Figuras 1A y B). Se han descongelado con éxito PGCs tras la crioconservación en un medio independiente de CO₂ que contiene un 10% de suero y un 10% de DMSO.

Ejemplo 2. Las PGCs cultivadas expresan CVH y Dazl

La expresión de *CVH*, que es el homólogo de pollo del gen específico de la línea germinal *VASA* en *Drosophila*, se limita a las células de la línea germinal de pollos, y se expresa en aproximadamente 200 células de la creciente germinal (Tsunekawa et al., 2000). La expresión de *CVH* es necesaria para la función adecuada de la línea germinal en machos; la pérdida de la función de *CVH* provoca infertilidad en ratones macho (Tanaka et al., 2000). La expresión de *Dazl* se limita a la línea germinal en ranas (Houston y King, 2000), ajolote (Johnson et al., 2001), ratones (Schrans-Stassen et al., 2001), ratas (Hamra et al., 2002), y seres humanos (Lifschitz-Mercer et al., 2000). La delección de *Dazl* condujo a defectos espermatogénicos en ratones transgénicos (Reijo et al., 1995).

Después de 32 días, las PGCs se lavaron con PBS, se sedimentaron y se aisló el mRNA de las muestras de tejido con el kit Oligotex Direct mRNA (Qiagen). Después se sintetizó cADN a partir de 9 μl de mRNA mediante el uso del sistema SuperScript RT-PCR para la síntesis de la primera cadena de cADN (Invitrogen). Se usaron dos μl de cADN en la reacción de PCR posterior. Las secuencias de los cebadores que se obtuvieron de la secuencia de *CVH* (número de acceso AB004836), la secuencia de *Dazl* (número de acceso AY211387), o la secuencia de β -actina (número de acceso NM_205518) fueron:

V-1 GCTCGATATGGGTTTTGGAT (SEQ ID N° 1)

V-2 TTCTCTGGGTTCCATTCTGC (SEQ ID N° 2)

Dazl-1 GCTTGCATGCTTTTCCTGCT (SEQ ID N° 3)

Dazl-2 TGC GTC ACA AAG TTA GGC A (SEQ ID N° 4)

Act-RT-1 AAC ACC CCA GCC ATG TAT GTA (SEQ ID N° 5)

Act-RT-2 TTT CAT TGT GCT AGG TGC CA (SEQ ID N° 6)

Se usaron los cebadores V-1 y V-2 para amplificar un fragmento de 751 pb a partir del transcrito de *CVH*. Se usaron los cebadores Dazl-1 y Dazl-2 para amplificar un fragmento de 536 pb a partir del transcrito de *Dazl*. Se usaron los

cebadores Act-RT-1 y Act-RT-R para amplificar un fragmento de 597 pb a partir del transcrito de β -actina de pollo endógeno. Se llevaron a cabo reacciones de PCR con AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 3. Las PGCs expresan la proteína CVH

5 La proteína se extrajo de PGCs recién aisladas mediante el uso del kit de extracción de proteínas de tejidos T-Per (Pierce). La proteína de las células se extrajo lisando las células en un 1% de NP₄O; 0,4% de desoxicolato EDTA 66 mM; Tris 10 mM, pH 7,4. Las muestras se analizaron en un gel del 4-15% de Tris-HCl Ready (Bio-Rad). Tras la transferencia a una membrana, se llevaron a cabo transferencias de Western con kits de sustrato quimioluminiscente Super Signal West Pico (Pierce) como se instruye. Se usó un anticuerpo anti-CVH de conejo como anticuerpo primario (dilución 1:300), y se usó un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a HRP (Pierce, 1:100.000) como anticuerpo secundario (Figura 3).

Ejemplo 4. Las PGCs cultivadas expresan telomerasa

15 Se sedimentaron células germinales primordiales y se lavaron con PBS antes de congelarlas a -80 °C hasta el análisis. Se prepararon extractos celulares y se analizaron según las indicaciones del fabricante mediante el uso del kit de detección de telomerasa TRAPeze (Serologicals Corporation), que se basa en el protocolo de amplificación de repeticiones teloméricas (TRAP) (Kim et al., 1994). Figura 4.

Ejemplo 5 Se pueden obtener células germinales embrionarias (EG) a partir de cultivos de PGCs

20 Se han obtenido células EG de pollo a partir de PGCs permitiendo que las células se adhieran a la placa, eliminando el FGF, SCF y suero de pollo, y cultivando las células en las mismas condiciones usadas para el cultivo de células ES (van de Lavoie et al., 2006 High Grade Somatic Chimeras from Chicken Embryonic Stem Cells, Mechanisms of Development 12, 31-41; van de Lavoie y Mather-Love (2006) Chicken Embryonic Stem Cells; Culture and Chimera Production, Methods in Enzymology, en prensa). La morfología de las células cEG es muy similar a la de las células cES (Figura 5A, B). Cuando se inyectan células cEG en embriones en Etapa X (E-G&K), tienen la capacidad de colonizar los tejidos somáticos y producir quimeras que, como individuos jóvenes, parecen idénticas a las quimeras producidas con células cES (Figura 6). Las células EG de pollo se observan en las líneas de PGCs transgénicas recién obtenidas y en las obtenidas de manera clonal. El análisis de Southern de las células EG obtenidas a partir de PGCs positivas para GFP (Figura 11) demuestra que las células EG se originan a partir de las PGCs

Ejemplo 6. Las PGCs macho cultivadas dan lugar a gametos funcionales en gallos

30 Se obtuvieron líneas de células germinales primordiales macho de embriones individuales de raza Barred Rock. Tras el establecimiento de la línea, las células se inyectaron en embriones en Etapa 13-15 (H&H). Fenotípicamente, los polluelos eclosionados se parecieron a la raza livornesa blanca. Los machos se criaron hasta la madurez sexual y se cruzaron con gallinas de raza Barred Rock (Tabla 1). La descendencia negra fue indicativa de la transmisión en la línea germinal de las PGCs inyectadas. La tasa de transmisión en la línea germinal de los gallos varió de <1% al 86 % (Tabla 1).

35 Tabla 1: Transmisión en la línea germinal de las células germinales primordiales macho inyectadas en la vasculatura de embriones en Etapa 14-15 (H&H).

Línea celular	Sexo	Edad	Nº de células inyectadas	Nº de gallos ensayados	Transmisión en la línea germinal*
PGC13	M	40	1200	3	0,1, 1,5, 17
		110	2500-3000	5	1, 1, 1,5, 3, 84
PGC21	M	44	1500	3	10, 16, 21
PGC34	M	47	3000	3	42, 74, 80
PGC35	M	35	3000	7	15, 23, 47, 61, 80, 85, 86
PGC51	M	47	3000	1	11
PGC54	M	47	3000	4	0,5, 2, 20, 24
PGC80	M	29	3000	1	55
PGC84	M	50	3000	1	70

*Cada valor representa la tasa de transmisión en la línea germinal de una quimera

Las PGCs también se pueden inyectar en la cavidad subgerminal de embriones en etapa X. Se inyectaron 1000 o 5000 PGCs después de 209 días de cultivo en embriones irradiados. Los polluelos macho eclosionados se criaron hasta la madurez sexual y se cruzaron para ensayar la transmisión de la línea germinal. En 3 de 4 gallos ensayados se observó que la transmisión de la línea germinal tuvo una frecuencia variable del 0,15 al 0,45%. Esto indica que las PGCs pueden colonizar la línea germinal cuando se inyectan antes de la gastrulación. La transmisión en la línea germinal de PGCs macho no se ha observado en 1.625 descendientes de 14 quimeras hembra.

Ejemplo 7. Las PGCs hembra cultivadas dan lugar a gametos funcionales en gallinas

Se inyectaron PGCs hembra de embriones de raza Barred Rock que se cultivaron 66 días en embriones de raza livornesa blanca en Etapa 13 - 16 (H&H), y todos los polluelos eclosionados fueron fenotípicamente de raza livornesa blanca. Las gallinas se criaron hasta la madurez sexual y se cruzaron con gallos de raza Barred Rock (Tabla 1). Las PGCs hembra se transmitieron a través de las quimeras hembra a frecuencias de hasta un 69%. (Tabla 1).

Tabla 2. Transmisión en la línea germinal de las células germinales primordiales hembra inyectadas en la vasculatura de embriones en Etapa 14-15 (H&H).

Línea celular	Sexo	Edad	Nº de células inyectadas	Nº de gallinas ensayadas	Transmisión en la línea germinal*
PGC56	H	66	3000	5	1, 2, 6, 52, 69
PGC85	H	47	3000	10	0, 0, 0, 2, 2, 4, 5, 10, 11, 12

*Cada valor representa la tasa de transmisión en la línea germinal de una quimera

También se inyectaron PGCs hembra en embriones receptores macho de raza livornesa blanca. Las quimeras macho se criaron hasta la madurez sexual y se cruzaron con gallinas de raza Barred Rock. No se observó transmisión en la línea germinal de las PGCs hembra en 506 descendientes de los tres gallos ensayados.

Ejemplo 8. La descendencia procedente de las PGCs es normal reproductivamente

Se cruzaron tres machos y 4 hembras de la descendencia procedente de PGCs no transgénicas. Entre un 53 y un 100 % de los huevos fueron fértiles (Tabla 3), y entre un 79 y un 100 % de los huevos fértiles dieron como resultado un embrión eclosionado (Tabla 3), lo que indica que la descendencia procedente de PGCs es normal reproductivamente.

Tabla 3. Parámetros reproductivos de la descendencia de PGCs obtenida de gallos quiméricos de la línea germinal.

Gallo	Gallina	Huevos puestos	Infértiles/muerte temprana	% de fertilidad	Nº eclosionado	% eclosionado de embriones fértiles
IV9-1-7 e IV9-1-8	IV9-1-1	36	17	53	15/19	79
IV9-1-2 e IV9-1-8	IV9-1-4	33	5	85	27/28	96
IV9-1-7 e IV9-1-8	IV9-1-5	38	8	79	28/30	93
IV9-1-2	IV9-1-6	12	0	100	12/12	100

Ejemplo 9. Sensibilidad de las PGCs a neomicina y puromicina

Se determinó la sensibilidad de las PGCs a puromicina y neomicina para establecer la concentración de puromicina y neomicina necesaria para permitir el crecimiento de las células que expresan resistencia a antibióticos bajo control del promotor CX que se expresa intensamente en todos los tejidos (Origen Therapeutics, sin publicar). Estos experimentos demostraron que es necesaria una concentración de 300 µg/ml de neomicina durante 10 días para eliminar todas las células sin transfectar. Una concentración de 0,5 µg/ml de puromicina fue suficiente para eliminar las PGCs en 7-10 días.

Ejemplo 10. Modificación genética de PGCs

Se añadieron veinte microgramos (20 µl) de un transgén cx-neo linealizado con NotI (véase la Fig. 8) a una población de $5,8 \times 10^6$ PGCs que habían estado en cultivo durante 167 días. Las células y el ADN se resuspendieron en 800 µl de tampón de electroporación, y se aplicaron 8 pulsos de onda cuadrada de 672 voltios y 100 µseg de duración. Después de diez minutos, las células se resuspendieron en medio de cultivo y se alicuotaron en placas de 24 pocillos. Dos días tras la electroporación, se añadieron 300 µg de neomicina por ml de medio para seleccionar las células que estaban expresando el transgén cx-neo. Las células se mantuvieron en selección durante 19 días.

Después de 19 días, las células se retiraron de la selección y se expandieron para el análisis. Se mantuvo una proporción de las PGCs con 300 µg/ml durante otros 31 días, lo que demuestra que las PGCs fueron funcionalmente resistentes al antibiótico.

Con respecto a la Figura 8, para el control de plásmido, el ADN del plásmido cx-neo se linealizó con NotI y después se digirió con EcoRI o BamHI para producir un fragmento que es ligeramente más pequeño (5 kb) que el plásmido intacto, lo que se demuestra mediante la digestión con HindIII. Se liberaron fragmentos internos de aproximadamente 2 kb del plásmido cx-neo mediante digestión con Styl o NcoI. Se liberó un fragmento interno mayor de aproximadamente 2,6 kb mediante digestión con EcoRI y KpnI. La digestión del ADN genómico de la línea de PGCs con EcoRI, BamHI y HindIII reveló bandas que son mayores de 6 kb, lo que ilustra que se incorporó el transgén cx-neo en el genoma de PGC. Los fragmentos internos revelados en el ADN plasmídico tras la digestión con Styl, NcoI y EcoRI con KpnI también estuvieron presentes en el ADN genómico de las PGCs, lo que indica que el transgén cx-neo se integró en el genoma de PGC sin ninguna alteración. Mediante el uso de las técnicas de construcción de transgenes convencionales se pueden incorporar elementos adicionales tales como elementos reguladores, promotores específicos de tejido y ADN exógeno que codifica proteínas, por ejemplo. Los anticuerpos monoclonales son el ejemplo preferido de una proteína codificada por el ADN exógeno, y los anticuerpos monoclonales humanos son las especies preferidas de los mismos.

Como se indicó anteriormente, el funcionamiento de las modificaciones genéticas en las PGCs para producir animales transgénicos solamente se ha demostrado en muy pocas especies. Se pueden conseguir manipulaciones genéticas análogas en PGCs de pollo haciendo referencia a las conseguidas mediante el uso de células ES en ratones. En ratones, se conoce bien el uso por separado de recombinación homóloga seguida de transferencia de cromosomas en células madre embrionarias (mES) para la producción de una descendencia quimérica y transgénica. Se han desarrollado técnicas potentes de recombinación homóloga específica de sitio o selección de genes (véase Thomas, K.R. y M.R. Capecchi, *Cell* 51: 503-512, 1987; revisión de Waldman, A.S., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 12: 49-64, 1992). La inserción de ADN clonado (Jakobovits, A., *Curr. Biol.* 4: 761-763, 1994) y la manipulación y selección de fragmentos de cromosomas mediante las técnicas del sistema Cre-loxP (véase Smith, A.J. et al., *Nat. Genet.* 9:376-385, 1995; Ramírez-Solís, R. et al., *Nature* 378:720-724, 1995; patentes de EE.UU. 4.959.317; 6.130.364; 6.130.364; 6.091.001; 5.985.614) están disponibles para la manipulación y transferencia de genes en células mES para producir quimeras genéticas estables. Muchas de tales técnicas que se ha demostrado que son útiles en los sistemas mamíferos estarían disponibles para aplicarlas en PGCs de pollo si estuvieran disponibles los cultivos necesarios.

Se cree en general que el genoma de las células germinales primordiales está en un estado latente, y por lo tanto la cromatina puede estar en un estado altamente condensado. Los ensayos exhaustivos de los protocolos de electroporación convencionales sugieren que son necesarios métodos especiales para introducir modificaciones genéticas en el genoma de las PGCs. Como se describe más adelante, los transgenes se pueden rodear con elementos aisladores obtenidos del locus de β-globina de pollo para mejorar la expresión. La inclusión de los elementos aisladores de β-globina produce de manera rutinaria clones que se pueden cultivar, analizar e inyectar en embriones receptores.

Los promotores convencionales que se usan para controlar la expresión de los genes de resistencia a antibióticos (p.ej. neomicina, puromicina, higromicina, his-D, blastidicina, zeocina, y gpt) se expresan de manera ubicua. En general, los promotores proceden de genes "constitutivos" tales como β-actina, CMV, o ubiquitina. Aunque los promotores constitutivos son útiles porque se expresan en general a niveles elevados en todas las células, continúan expresándose en la mayoría de tejidos, si no en todos, durante toda la vida del pollo. En general, la expresión se debería limitar solamente al tejido y la etapa del desarrollo durante la que es necesaria la expresión. Para la selección de las células germinales primordiales, el periodo durante el que es necesaria la expresión es cuando están in vitro, cuando el antibiótico está presente en los medios. Una vez que se han insertado las células en el embrión, es preferible terminar la expresión del marcador seleccionable (es decir, el gen de resistencia a antibióticos). Para restringir la expresión de los genes de resistencia a antibióticos, se usa el promotor de "respuesta temprana a inducción neural" (ERNI). Un ERNI es un gen que se expresa de manera selectiva durante las etapas tempranas del desarrollo (p.ej., la Etapa X (E-G&K)) y en cultivo, y, por lo tanto, este promotor se usa para controlar la expresión de genes de resistencia a antibióticos para seleccionar las PGCs que portan una modificación genética. Debido a que ERNI se expresa solamente durante las etapas tempranas del desarrollo, los genes que confieren resistencia a antibióticos no se expresan en los animales maduros.

Ejemplo 11. Homogeneidad de cultivos celulares de PGCs a largo plazo

Para determinar la homogeneidad de los cultivos de PGCs tras el cultivo a largo plazo, se tiñeron ES, EG, DT40 (línea de células B de pollo) y PGCs con anti-CVH, un anticuerpo hacia el homólogo de Vasa de pollo y el anticuerpo 1B3 (Halfter, W., Schurer, B., Hasselhorn, H. M., Christ, B., Gimpel, E., y Epperlein, H. H., *An ovomucin-like protein on the surface of migrating primordial germ cells of the chick and rat. Development* 122, 915-23. 1996)). La expresión del anticuerpo CVH se limita a las células germinales y, por lo tanto, el anticuerpo anti-CVH es un marcador fiable de ellas. El antígeno 1B3 reconoce una proteína similar a ovomucina presente en la superficie de las PGCs de pollo durante su migración y la colonización de la gónada.

Las células se lavaron en CMF/2% de FBS, se fijaron en un 4% de paraformaldehído durante 5 minutos y se lavaron de nuevo. Las alícuotas de células en las que realizar la tinción de Vasa se permeabilizaron con un 0,1% de TritonX-100 durante 1-2 minutos. Se añadió el anticuerpo primario durante 20 minutos, las células se lavaron dos veces y se incubaron con un anticuerpo secundario (Alexa 488 anti-IgG de conejo para CVH y control y Alexa 488 anti-IgM de conejo para 1B3) durante 15 minutos. Como controles, las alícuotas de células se tiñeron solamente con el segundo anticuerpo. Después de 2 lavados adicionales, las células se prepararon para el análisis FACS.

Con respecto a la Figura 9, las células DT40, ES y EG mostraron una señal de fondo al tñirlas con CVH y el Ab 1B3. Las PGCs, sin embargo, se tiñeron mucho más intensamente con CVH y el anticuerpo 1B3. Existe una pequeña población de PGCs que no se tiñen con CVH ni 1B3, lo que indica que una pequeña proporción de las células no expresan el fenotipo de PGC. Dos líneas de PGCs originales y 4 líneas de células transfectadas (G-09, P84, P97/6 y P97/33) obtenidas de la línea celular originaria PGC13 se ensayaron con el anticuerpo hacia Vasa y 1B3 (PGC13 y 102). Todas muestran el mismo patrón, lo que indica que los diversos cultivos de PGC contienen la misma proporción elevada de células que expresan el fenotipo de PGC.

Ejemplo 12: Modificación genética de células germinales primordiales

La electroporación con un plásmido CX-GFP circular reveló que la tasa de transfección transitoria en PGCs varió entre un 1-30%. Mediante el uso de 8 pulsos de onda cuadrada de 100 μ seg y 800 V se obtuvo una línea celular de PGCs que portaba una construcción CX-neo, que se denominó G-09. Véase la Figura 8. La integración de la construcción se evaluó mediante el uso de un análisis de transferencia de Southern. El aislamiento de esta línea transfectada de manera estable, sin embargo, fue un suceso falso que no se repitió en los experimentos posteriores. Con la excepción de G-09, no se consiguió una transfección estable de PGCs después de someter a electroporación a 17×10^7 PGCs con construcciones linealizadas en 37 experimentos de transfección mediante el uso de pulsos de onda cuadrada y de caída exponencial. En cada uno de estos experimentos, el número de PGCs varió de 1×10^6 a 10×10^6 . Se ensayaron los siguientes promotores, usados de manera generalizada en la investigación de células ES en ratón, pollo y seres humanos: El promotor CX, también denominado CAG (Niwa, H., Yamamura, K., y Miyazaki, J., Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193-9.1991)), que contiene el promotor de β -actina de pollo con un potenciador de CMV, el promotor PGK, el promotor MC1 y el promotor Ubc. Ninguno de estos promotores incrementó la eficacia de la transfección. Para permitir la expresión de los marcadores seleccionables y la obtención clonal de líneas celulares modificadas genéticamente, se han usado aisladores con las construcciones integradas.

Los aisladores son secuencias de ADN que separan los dominios de cromatina activos de los inactivos, y aíslan los genes de los efectos activantes de los potenciadores cercanos, o de los efectos de silenciamiento de la cromatina condensada cercana. En pollos, el aislador 5'HS4 localizado en posición 5' del locus de β -globina ha sido bien caracterizado por Felsenfeld y colaboradores (Burgess-Beusse, B., Farrell, C., Gaszner, M., Litt, M., Mutskov, V., Recillas-Targa, F., Simpson, M., West, A., y Felsenfeld, G. (2002)). The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99 Supl. 4, 16433-7. Este aislador protege el locus de β -globina de una región en dirección 5' de cromatina condensada de manera constitutiva. Se construyó un transgén con el promotor de β -actina de pollo que controlaba la resistencia a neomicina mediante el uso de la secuencia de 5'HS4 de β -globina de pollo como aisladores en 5' y 3' del casete de β -actina-neo de pollo.

La secuencia central de 250 pb del sitio hipersensible 4 del locus de β -globina de pollo se amplificó mediante PCR con el grupo de cebadores siguiente:

HS4-Bam-F: AGGATCCGAAGCAGGCTTTCTGGAAGG (SEQ ID N° 7)

HS4-Bgl-R: AAGATCTTCAGCCTAAAGCTTTTCCCGT (SEQ ID N° 8)

El producto de PCR se clonó en pGEM-T y se secuenció. Se hizo una duplicación en tándem del sitio HS4 digiriendo el HS4 del clon pGEM con BamHI y BglIII para liberar el inserto, y BglIII para linealizar el vector. El fragmento de HS4 se ligó al vector que contenía una copia del aislador HS4. Se cribaron los clones y se seleccionó uno en el que las dos copias de HS4 están en la misma orientación. Este se denominó 2X HS4.

Ejemplo 13: Selección en bruto mediante el uso de HS4 β -Actina-neo.

Se obtuvo β -actina neo de Buerstedde (clon 574) y se transfirió a pBluescript. Después se clonó 2X HS4 en los extremos 5' y 3' de β -actina neo para producir HS4- β -actina neo. Se llevaron a cabo ocho transfecciones mediante el uso de esta construcción. Para cada transfección, se resuspendieron 5×10^6 PGCs en 400 μ l de tampón de electroporación (Specialty Media), y se añadieron 20 μ g de ADN linealizado. Se administró un pulso de caída exponencial (ED) (200 V, con 900-1100 μ F) u ocho pulsos de onda cuadrada (SW) (250-350 V, 100 μ seg). Tras la transfección, las células se cultivaron durante varios días antes de la selección con neomicina (300 μ g/ml). Cada transfección se cultivó como una mezcla. Las células resistentes se aislaron a partir de 5 de 8 transfecciones.

Se llevó a cabo un análisis de Southern en 2 mezclas de células transfectadas (Figura 10). Se digirieron dos μ g de ADN genómico de las líneas de PGCs P84 y P85, y 20 pg de plásmido (HS4- β -actina neo). Las digestiones se analizaron en un gel del 0,7%, se transfirieron mediante transferencia capilar en SSC 10X a una membrana de nailon

durante la noche, y se aplicó una sonda con secuencias del gen neo radiomarcadas durante 2 horas en Rapid Hyb (Amersham). Después de lavar, la transferencia se expuso a una película durante la noche a -80°C . Con respecto a la Figura 10, el carril 1 es P84, el carril 2 es P85 y el carril 3 es el plásmido. Para el control de plásmido, se linealizó el ADN plasmídico HS4- β -actina-neo con Not1. Para obtener un fragmento interno de 2,3 Kb se digirió el ADN de PGC y el plásmido linealizado con BamH1. Tanto P84 como P85 muestran un fragmento interno de un tamaño de 2,3 Kb. Se liberó un fragmento interno mayor de aproximadamente 2,6 kb mediante digestión con HindIII. De nuevo, este fragmento interno está presente en las digestiones de P84 y P85. La digestión del ADN genómico de P84 y P85 con EcoR1 y BglII debería revelar bandas mayores de 2,9 Kb si los transgenes están integrados en el genoma. En P84 no se observan fragmentos de unión, lo que indica que P84 es una composición de varios clones diferentes. En P85, los fragmentos de unión de 4,5-5 kb están presentes en la digestión con EcoR1, y un fragmento de unión de 5 Kb está presente en la digestión con BglII, lo que indica que P85 está integrado en el genoma y que el cultivo está constituido sustancialmente de un clon. Este ejemplo muestra la utilidad de los aisladores como elemento preferido de una construcción para la expresión fiable de marcadores seleccionables en células germinales primordiales.

Ejemplo 14: Obtención clonal de PGCs modificadas genéticamente

Los siguientes ejemplos muestran que se pueden obtener de manera clonal líneas modificadas genéticamente de células germinales primordiales.

Primero, se produjo β -actina-eGFP. El gen eGFP se liberó de CX-eGFP-CX-puro con XmnI y KpnI, se liberó β -actina de HS4- β -actina puro con EcoRI y XmnI, y los dos se clonaron en forma de una ligadura de 3 miembros en pBluescript digerido con EcoRI y KpnI para producir β -actina eGFP. Después, se liberó β -actina eGFP con BamHI y KpnI (extremos romos con T4 ADN polimerasa) y se clonó en HS4- β -actina puro digerido con BglII y EcoRV.

Se llevaron a cabo cinco transfecciones mediante el uso de esta construcción. Para cada transfección, se resuspendieron 5×10^6 PGCs en 400 μl de tampón de electroporación (Specialty Media), y se añadieron 20 μg de ADN linealizado. Se administró un pulso ED (150-200 V; 900 μF) o pulsos SW (350 V, 8 pulsos, 100 μseg). Tras la transfección, las células se colocaron en placas de 48 pocillos individuales y se cultivaron durante varios días antes de añadir la selección (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se observaron un total de 5 clones en 4 de las 5 transfecciones. Se analizó un clon TP103 mediante Southern (Figura 11). Con respecto a la Figura 11, el ADN de control de plásmido se linealizó con NotI. Se liberó un fragmento interno digiriendo el ADN con KpnI. En TP103 y en el plásmido, se liberó un fragmento del mismo tamaño. La digestión del ADN genómico de TP103 con NcoI, MfeI, y SphI debería revelar bandas que son mayores que los carriles correspondientes de ADN plasmídico digerido. No se observa ninguna banda en el carril de ADN genómico de TP103 digerido con MfeI, lo que se puede deber a que la banda sea demasiado grande. En los carriles que representan las digestiones con NcoI y SphI, se han liberado fragmentos del ADN genómico de TP103 que son sustancialmente mayores que los fragmentos liberados del ADN plasmídico, lo que indica que el transgén está incorporado en el genoma de la línea celular TP103.

Obtención clonal de HS4- β -actina-puro.

Primero, se produjo β -actina puro mediante una ligadura de 3 miembros de puro de CX-eGFP-CX-puro (XmnI-EcoRI), β -actina de β -actina neo en pBS (véase anteriormente) (Sal-XmnI), y pBluescript (Sall-EcoRI). A continuación, se clonó β -actina puro en pBS que contenía dos copias de 2X HS4 ligando β -actina puro digerida con BamHI en el vector 2X HS4 tratado con BamHI/SAP.

Se llevaron a cabo tres transfecciones mediante el uso de esta construcción. Para cada transfección, se resuspendieron $4 \cdot 5 \times 10^6$ PGCs en 400 μl de tampón de electroporación (Specialty Media), y se añadieron 20 μg de ADN linealizado. Se administró un pulso ED de 200 V, 900 μF . Tras la transfección, las células se colocaron en placas de 48 pocillos individuales y se cultivaron durante varios días antes de añadir la selección (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). No se observaron colonias en 2 transfecciones. Se aislaron dos colonias de la tercera transfección.

Obtención clonal de HS4-cx-eGFP-cx-Puro.

Se llevaron a cabo tres transfecciones con HS4-cx-eGFP-cx-Puro. Se resuspendieron 5×10^6 PGCs en 400 μl de tampón de electroporación (Specialty Media), y se añadieron 20 μg de ADN linealizado. Se administraron ocho pulsos SW de 350 V durante 100 μseg a cada transfección. Tras la transfección, las células se colocaron en placas de 48 pocillos individuales, y se cultivaron durante varios días antes de añadir la selección de puomicina (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se aislaron un total de 16 clones de 2 transfecciones.

Obtención clonal de cx-neo.

La línea celular PGC13 se sometió a electroporación con un plásmido que portaba un marcador seleccionable cx-neo. Tras la exposición a neomicina, se obtuvo una línea celular que fue resistente a neomicina (G-09). Se determinó el cariotipo de esta línea celular, y todas las células exhibieron una deleción en el brazo p del cromosoma 2 (Tabla 3 y Figura 12). Estos datos demuestran que G-09 se obtuvo clonalmente de una PGC que portaba una deleción distintiva en el brazo p del cromosoma 2.

Tabla 3: Análisis cromosómico de la línea celular G-09.

Célula	Cromosomas						Micros
	1	2	2p-	3	4	Z	
1	2	1	1	2	2	2	69
2	2	1	1	2	2	2	44
3	2	1	1	2	2	2	56
4	2	1	1	2	2	2	56
5	2	1	1	2	2	2	65
6	2	1	1	2	2	2	67
7	2	1	1	2	2	2	59
8	1	0	1	1	2	1	38
9	2	1	1	2	2	2	65
10	2	0	1	2	2	2	55
11	2	1	1	2	2	2	43
12	2	1	1	2	2	2	59
13	2	0	1	2	2	2	55
14	2	0	1	2	2	2	33
15	1	1	1	2	2	2	56
16	2	1	1	2	2	2	62

Ejemplo 15: Expresión específica de tejido de marcadores seleccionables en PGCs.

5 El gen ERNI se expresa desde la etapa de línea pre-primitiva en el embrión de pollo, y es un gen de respuesta temprana a señales del nódulo de Hensen, Streit, A., Berliner, A. J., Papanayotou, C., Sirulnik, A., y Stem, C. D. (2000). Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature* 406, 74-8. Además, ERNI se expresa en las células ES de pollo, Acloque, H., Risson, V., Birot, A., Kunita, R., Pain, B., y Samarut, J. (2001). Identification of a new gene family specifically expressed in chicken embryonic stem cells and early embryo. *Mech Dev* 103, 79-91. El gen ERNI (también denominado cENS-1) tiene una estructura poco habitual en la que un único marco de lectura abierto largo está flanqueado por una repetición directa de 486 pb, además de secuencias UTR en 5' y 3' únicas. Basándose en la idea de que esta estructura recuerda a la de una estructura similar a las LTR retrovirales, Acloque et al. 2001 ensayaron diferentes porciones de la secuencia de cADN en función de la actividad promotora/potenciadora, y descubrieron que una región de la secuencia única en la UTR de 3' actúa como promotor. Se diseñaron cebadores de PCR básicamente como se describió (Acloque et al., 2001) para amplificar un fragmento de 822 pb de la UTR de 3' del gen ERNI. Tras la amplificación de las secuencias ERNI, se clonaron en posición 5' del gen de resistencia a neomicina, con un sitio de poliA de SV40, para generar ERNI-neo (1,8 kb). El aislador 2X HS4 se clonó después a cada lado del casete con marcador seleccionable ERNI-neo.

20 Se llevaron a cabo dos transfecciones con HS4-Erni-neo. Se resuspendieron 5×10^6 PGCs en 400 μ l de tampón de electroporación (Specialty Media), y se añadieron 20 μ g de ADN linealizado. En la primera transfección, se administró un único pulso ED de 175 V, 900 μ F, y en la segunda transfección, se administraron 8 pulsos SW de 100 μ seg y 350 V. Tras la transfección, las células se colocaron en placas de 48 pocillos individuales, y se cultivaron durante varios días antes de añadir la selección de neomicina (300 μ g/ml). En la primera transfección (pulso ED) se aislaron 5 colonias, y en la segunda transfección (pulsos SW) se aislaron 11 colonias.

25 El aislamiento de clones transfectados de manera estable indica que ERNI se expresa en las PGCs, y se puede usar como un promotor específico de tejido.

Ejemplo 16: Contribución de las PGCs transfectadas a la línea germinal.

30 Se transfectaron PGCs con HS4- β actina-GFP y se inyectaron en la vasculatura de embriones en Etapa 13-15 (H&H). En D18, se recuperaron las gónadas, se fijaron, se realizaron cortes del tejido y se tiñeron con el anticuerpo CVH para identificar las células germinales. Los cortes de tejido se analizaron después en busca de la presencia de células positivas para GFP en las gónadas. Se hallaron células germinales positivas para GFP en las gónadas de machos (Figura 13) y hembras. El examen de las preparaciones histológicas de cerebro, músculo cardíaco e hígado

de estos embriones mostró solamente cuatro células verdes en un portaobjetos. Estos datos demuestran que se hallan unas pocas PGCs cultivadas en localizaciones ectópicas, pero la gran mayoría de las PGCs cultivadas colonizan preferentemente la línea germinal.

5 Para determinar que las células positivas para GFP fueron células germinales, se tiñeron los cortes con el anticuerpo anti-CVH. Como se puede observar en la Figura 14, las células positivas para GFP también se tiñen para la proteína CVH, lo que indica que las células positivas para GFP son células germinales.

10 Con respecto a la Figura 14, hay células positivas para GFP en este corte, y el panel de DAPI/GFP muestra que estas células positivas para GFP están localizadas dentro del túbulo seminífero. Cuando las células germinales se tiñen con el anticuerpo anti-CVH, exhiben un anillo teñido de rojo intenso que delimita el citoplasma de las células germinales. El panel de DAPI/CVH muestra que estas células están localizadas dentro del túbulo seminífero. El último panel muestra que las células positivas para GFP también se tiñen para CVH, y que los túbulos seminíferos contienen células germinales positivas para CVH que son negativas para GFP.

Ejemplo 17. Transmisión en la línea germinal de PGCs modificadas genéticamente.

15 Se transfectaron PGCs de raza Barred Rock con uno de los transgenes siguientes: Se inyectó β actina-neo, β actina-eGFP- β actina-puro, cx-eGFP-cx-puro en la vasculatura de embriones en Etapa 13-14 (H&H). Los polluelos eclosionaron, los gallos se criaron hasta la madurez sexual y se cruzaron con gallinas Barred Rock para determinar la transmisión en la línea germinal del transgén. Toda la descendencia negra procedió de las PGCs, y se ensayó la presencia del transgén (Tabla 5). Se calculó la tasa de transmisión en la línea germinal dividiendo el número de polluelos negros por el número total de polluelos en los que se puntuó el color de las plumas (Tabla 5).

20 Tabla 5: Transmisión en la línea germinal de células germinales primordiales modificadas genéticamente.

Línea celular	Línea celular originaria	Edad de las células	Construcción	Gallos ensayados	Nº de descendencia	% de la línea germinal
TP84	PGC13	267	β actina-neo	5	892	0, 0, 0, 0, 0
TP85	PGC13	260-267	β actina-neo	12	2462	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 5, 1
TP103/38	PGC54	134-138	β actina-GFP	8	758	0, 1, 11, 12, 13, 16, 28, 92
TP112/44	PGC13	280	cx-GFP	4	168	0, 0, 0, 4
TP112/21	PGC13	280	cx-GFP	3	378	0, 1, 10

Ejemplo 18. Los transgenes se heredan de manera mendeliana

25 La descendencia negra de los cruces entre gallos quiméricos que portaban PGCs de la raza Barred Rock que se modificaron genéticamente para que incluyeran uno de β actina-neo, β actina-GFP, o cx-GFP se analizó en busca de la presencia del transgén. Como se muestra en la Tabla 6, el transgén es heredado por aproximadamente un 50 % de la descendencia de las PGCs, lo que indica una herencia mendeliana.

Tabla 6. Segregación mendeliana del transgén.

Construcción	Nº de descendencia negra	Nº de descendencia no transgénica	Nº de descendencia transgénica
β actina-neo	3	1	2*
β actina-GFP	176	93	83*
cx-GFP	23	9	14*

*no es significativamente diferente de la proporción 1:1 esperada de descendencia transgénica:no transgénica mediante análisis de χ^2

Ejemplo 19: Expresión ubicua de transgenes en la descendencia de quimeras que portan PGCs modificadas genéticamente

30 Se cruzaron quimeras que portaban PGCs en las que se había integrado de manera estable β actina-GFP en el genoma con gallinas de tipo natural, y los embriones se puntuaron por la expresión de GFP. Se muestran ejemplos de expresión en embriones en la Figura 15, que muestra que la GFP se expresa en todos los tejidos de la descendencia transgénica hasta la Etapa 34 (H&H) del desarrollo. En los animales de más edad, se prepararon los tejidos para el examen histológico mediante el uso de cortes congelados. Los tejidos de páncreas, piel, pulmón,

cerebro, ovario, riñón, bolsa, duodeno, mama, corazón, hígado, y bazo de pollos de 1 a 2 semanas de edad demostraron que la expresión sigue siendo ubicua en los animales tras la eclosión.

Ejemplo 20: Expresión de un anticuerpo monoclonal en clara de huevo de pollos transgénicos (como ilustración solamente)

5 Como se indicó anteriormente, este anticuerpo monoclonal es solamente un ejemplo de varios tipos de productos de anticuerpos monoclonales que se pueden expresar mediante el uso de las construcciones de transgenes de la invención. Además, los anticuerpos monoclonales como clase de proteínas son solamente un ejemplo de muchas clases de productos proteicos que se pueden expresar de una manera específica de tejido de acuerdo con los métodos y las técnicas descritas en la presente memoria. El siguiente Ejemplo se usa para expresar cualquier proteína o anticuerpo con una secuencia codificante conocida.

10 El vector usado para expresar anticuerpos monoclonales en las células de las glándulas tubulares del oviducto de pollo se denomina OvBAC. Este vector está compuesto de un clon BAC intacto del locus de ovoalbúmina de pollo, que incluye el gen estructural de ovoalbúmina y secuencias flanqueantes en 5' y 3'. La inserción de un casete de anticuerpo monoclonal (que contiene un gen que codifica IgL humana y un gen que codifica IgH humana, unidos mediante una secuencia IRES) en el gen de ovoalbúmina del BAC, de forma que el codón de inicio de la traducción de ovoalbúmina se fusiona al codón iniciador de IgL, controla la expresión del anticuerpo monoclonal en el oviducto a niveles elevados. El anticuerpo expresado en el oviducto se secreta y se deposita en la clara del huevo.

15 Se diseñó un casete modular de anticuerpo monoclonal en el que se colocaron estratégicamente sitios únicos para enzimas de restricción para la inserción sencilla de los genes de la región variable de las cadenas pesada y ligera que codificarán la región variable de cualquier anticuerpo monoclonal deseado que conduce a la expresión de IgGk humana de longitud completa. Este casete, una vez modificado con las regiones variables de interés, se inserta después en el OvBAC para la expresión del MAb en el oviducto. El casete contiene la región constante C_k humana, la región constante C_γ1 humana, y porciones del intrón kappa J-C humano y del intrón en 5' de C_γ1 humana. También están presentes el péptido señal para el gen VH y un intrón pequeño en posición 3'; sin embargo, el péptido señal VL no está presente. Hay presente una secuencia IRES entre los genes IgL e IgH, de forma que se expresa el anticuerpo completo a partir de un único transgén. Se insertan genes de la región variable en uno de los sitios de restricción únicos (tal como *Sna*BI o *Srf*I para VL; *Nru*I o *Pme*I para VH) que están situados en los intrones en 5' de los genes de la región constante. Los genes de la región variable deben contener secuencias donantes de corte y empalme, de forma que son sometidos a corte y empalme en los genes de la región constante para una expresión adecuada. Los genes de la región variable reordenados y expresados se amplifican mediante PCR a partir del ADN genómico de un hibridoma o a partir del ADN recombinante obtenido a partir del hibridoma. La secuencia líder del péptido señal para la cadena ligera se debe añadir en el momento de la amplificación de V de la cadena ligera; el péptido señal de la cadena pesada está presente en el casete, y por lo tanto no es necesario al insertar V de la cadena pesada. Para el gen VL, los cebadores de PCR se diseñan para que incluyan lo siguiente. El cebador de 5' en el lado de 5' del gen VL incluirá: un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Sna*BI; la secuencia consenso Kozak ATG y un péptido señal; y alrededor de 20 pb de homología para la región V de interés para cebar la reacción de PCR. Si se usa un clon de cADN como molde en la PCR, el exón del péptido señal ya estará fusionado al resto del gen VL; de otra manera, se diseñará el cebador para añadir un péptido señal de VL humano, en el marco de lectura, al extremo N-terminal de la región variable madura. Esta etapa puede requerir dos rondas de PCR anidada para añadir las secuencias necesarias, ya que los cebadores serán largos si se añade el péptido señal en una etapa. En el extremo 3' del gen VL, se diseñan cebadores de PCR para que incluyan: un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Sgf*I; alrededor de 20 pb de homología en el extremo 3' de la región V de interés; y alrededor de 20 pb de la secuencia intrónica J-C_γ, que incluye el donante de corte y empalme para el corte y empalme al gen C_γ de 3'. Para el gen VH, el cebador de 5' para la amplificación mediante PCR incluye un sitio de reconocimiento para la enzima *Nru*I, alrededor de 20 pb del intrón de VH que está presente en la secuencia del péptido señal (que incluye el aceptor de corte y empalme para el corte y empalme al donante de corte y empalme del péptido señal de VH en el casete modular), 11 pb de la secuencia codificante del péptido señal de VH, y alrededor de 20 pb de homología con el extremo 5' del gen VH de interés. El cebador de 3' incluye alrededor de 20 pb de homología con el extremo 3' del gen VH de interés (que corresponde a la región J), alrededor de 20 pb del intrón J-C_μ (que incluye el donante de corte y empalme para el corte y empalme al gen C_γ1 de 3'), y un sitio de reconocimiento para la enzima *Nru*I. Los productos de PCR para VL y VH se clonan y se secuencian antes de la inserción en el vector del casete de MAb modular.

20 El clon OvBAC se modifica mediante ingeniería de recombinación para insertar el casete MAb en las secuencias de ovoalbúmina como se describió en Copeland, N. G., Jerkins, N. A., Court, D. L. (2001). Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet* 2, 769-79. Se añade un marcador seleccionable (para la resistencia a neo o puromicina) al OvBAC mediante actualización del diseño, Wang, Z., Engler, P., Longacre, A., Storb, U. (2001). An efficient method for high-fidelity BAC/PAC retrofitting with a selectable marker for mammalian cell transfection. *Genome Res.* 11.137-42.

Ejemplo 21: Anti-IL-2R α en clara de huevo de pollos transgénicos (como ilustración solamente)

60 La estrategia global para expresar un MAb específico del receptor IL-2R α humano es como sigue (véanse las

Figuras 16 y 18). En la etapa 1, se inserta el casete IgL/IgH anti-IL-2R α en el Ov BAC mediante recombinación homóloga en *E. coli* mediante ingeniería de recombinación. El anticuerpo está entonces bajo control transcripcional de los elementos reguladores de Ov. En la etapa 2, se elimina el gen de kanamicina usado en la ingeniería de recombinación mediante la F1p recombinasa. Las secuencias codificantes de V del anticuerpo anti-IL-2R α humanizado se clonan en un casete que contiene las regiones constantes C κ y C γ 1. Los genes Ig κ e IgH se unen mediante una secuencia IRES, de forma que ambos genes se expresan a partir de una única construcción de transgén, y por lo tanto solamente es necesaria una única transfección con BAC. El casete de anticuerpo se inserta en el gen Ov del BAC mediante recombinación homóloga (Lee y Copeland, 2001). El gen Ig κ se fusiona a la secuencia Kozak de inicio de la traducción de Ov para una traducción eficaz. Finalmente se añade ERNI-puro, que es un marcador seleccionable en PGCs, al BAC para la transfección y selección de los clones de PGC.

La Figura 16 muestra la construcción de OvBAC-anti-IL-2R α . Para obtener los genes de la región variable de la cadena pesada y ligera, se sintetizan 4 oligonucleótidos largos (con alrededor de 20 pb de solapamiento) para cada gen y se hibridan entre sí. Los huecos se rellenan con ADN polimerasa (del bacteriófago T4). Los genes sintéticos se digieren entonces con enzimas de restricción para la clonación en el casete del MAb.

Los oligonucleótidos para la construcción del Mab anti-IL-2R α humanizado (las secuencias del MAb son de la patente US5585089) son los siguientes.

Gen V de la cadena ligera (oligos 1-4):

Oligo 1: ctc TCTAGA caactcagagttcaccatg gagaccga taccctcctg ctatgggtcc tctgctatg ggtcccagga tcaaccggag // atattcagat gaccacagct ccatctaccc tctctgctag cgtcggggat (SEQ ID N° 9)

Oligo 2: ataaattaga agcttgggag cttgctgctg ctctgctggtg taccagtga tgtaacttat actúantgagctg gcagagcagg ttatggtgac cctatccccg acgctagcag agag (SEQ ID N° 10)

Oligo 3: gctccaagc ttctaattta taccacatcc aacctggctt ctggagtccc tgctcgcttc agtggcagtg gatctgggac cgagttcacc ctcaaatca gctctctgca gccagatgat ttc (SEQ ID N° 11)

Oligo 4: ctc GCGATCGC caatagtgaaaattac gtttgac ctccacctg gtcccctgac cgaacctgag tgggtaagta ctctttgat ggagtaata agtggcgaaa tcatctggct gcagagagct ga (SEQ ID N° 12)

Con respecto a la Figura 17, el Oligo 1 tiene un sitio XbaI para la clonación (letras mayúsculas), seguido del péptido señal de VL (sin intrón). La secuencia Kozak de inicio de la traducción de Ov está subrayada; los tres últimos nucleótidos son el codón iniciador. El sitio de escisión del péptido señal (en la secuencia proteica correspondiente) se indica mediante una doble barra. El Oligo 4 tiene un sitio SgfI para la clonación (letras mayúsculas), seguido de 17 pb del intrón J4-C κ de 5' humano para el corte y empalme a C κ (subrayado). El nucleótido G donante de corte y empalme está subrayado doblemente.

Gen V de la cadena pesada (oligos 5-8):

Oligo 5: ctc TCGCGA tctctctgttcacag gcgtgcactct // cagg tccagctgtt ccagctctggg gctgaagtca agaaacctgg ctcgagcgtg aaggct (SEQ ID N° 13)

Oligo 6: cccagctgac ggattaatat atccaatcca ttccagacc tgtccagggg cctgccttac ccagtgcatc ctgtagctag taaaggtgta gccagaagcc ttgcaggaga ccttcacgct cgagccagg (SEQ ID N° 14)

Oligo 7: tatattaatc cgtcgactgg gtatactgaa tacaatcaga agttcaagga caaggcaaca attactgcag acgaatccac caatacagcc tacatggaac tgagcagcct gagatctgag gaca (SEQ ID N° 15)

Oligo 8: ctc TCGCGA ggccattcttac ct gaggagactg tgaccaggtt tcctggccc cagtagtcaa agaccccccc cctcttgca cagtaataga ctgcggtgct ctcagatctc aggtgct (SEQ ID N° 16)

El Oligo 5 contiene un sitio NruI (letras mayúsculas) para la clonación, seguido de 15 pb del extremo 3' del intrón del péptido señal de VH humano (subrayado), seguido de 11 pb de la secuencia del exón del péptido señal de VH del gen VH anti-IL-2R α humanizado (subrayado doble). El sitio de escisión del péptido señal (en la secuencia proteica correspondiente) se indica con una doble barra.

El Oligo 8 contiene un sitio NruI (letras mayúsculas) seguido de 12 pb del extremo 5' del intrón J-C μ humano (subrayado). El nucleótido C donante de corte y empalme está subrayado doblemente.

Se mezclan los Oligos 1-4, se mezclan los oligos 5-8, y las dos mezclas se hibridan incubando en un vaso de precipitados con agua hirviendo que se deja enfriar lentamente hasta temperatura ambiente. Los huecos en las cadenas complementarias se reparan con ADN polimerasa.

Con respecto a la Figura 18, las Vs de Ig κ e IgH se clonan en el casete que contiene los genes C κ y C γ 1, mediante el uso de sitios de restricción únicos diseñados en los extremos 5' y 3' de las Vs (en este ejemplo, NruI para V de la cadena pesada y XbaI/SgfI para V de la cadena ligera).

Con respecto de nuevo a la Figura 18, el OvBAC se muestra en la parte superior, con 110 kb de la secuencia de 5' del gen estructural Ov, y 30 kb de la secuencia flanqueante de 3' del gen estructural Ov. El marcador seleccionable ERNI-puro se muestra en el extremo 3'. El casete de MAb se muestra con los elementos siguientes (izquierda a derecha): el brazo de homología de Ov de 5' para la inserción en el OvBAC mediante recombinación homóloga; la

- 5 Kozak y ATG de Ov; el péptido señal de VL humano (SIGVL); el gen de la región variable de la cadena ligera humana insertado del MAb (VL); el intrón J-C κ ; el gen C κ ; el IRES para la traducción del gen IgH de 3'; el péptido señal de la cadena pesada humana (SIGVH); el gen de la región variable de la cadena pesada insertado del MAb (VH); el intrón J-C γ ; el gen C γ 1 que incluye sus intrones internos; y el brazo de homología de Ov de 3' para la inserción en el OvBAC. (No se muestra el gen de kanamicina para la selección en bacterias).
- 10 Para la inserción del casete de anticuerpo en el OvBAC, se produce un vector de selección de ingeniería de recombinación añadiendo brazos de homología al casete Ig κ -IRES-IgH. Los brazos de homología son fragmentos del locus Ov que actúan para seleccionar como objetivo el casete de anticuerpo para el gen Ov en el BAC, mediante el uso de la maquinaria de recombinación homóloga de la cepa de *E. coli* EL250 que alberga el BAC (Lee y Copeland, 2001). El brazo de homología de Ov de 5' está a 124 pb de la secuencia de ovoalbúmina que
- 15 corresponde al fragmento HincII - XbaI localizado inmediatamente en posición 5' de la secuencia Kozak de inicio de la traducción en el gen Ov, y tiene la secuencia siguiente:

5'-gttaacatttaattgcctaaaaactgctcgttaatttactgttgtagcctaccatagagtaccctgcatggtactatgtac

agcattccatccttacattttcactgttctgctgtttgctctaga-3' (SEQ ID N° 17)

El brazo de homología de 5' se amplifica mediante PCR a partir de ADN genómico de pollo o ADN de Ov clonado con el uso de los cebadores siguientes:

- 20 K8 HincII-F 5'- GGA TAT AGC AAC AGA CAC ATT AC-3' (SEQ ID N° 18)

K8-TTT NotI XbaI-R 5'-TTT GCG GCC GCT CTA GAG CAA ACA GCA GAA C-3' (SEQ ID N° 19)

El brazo de homología de Ov de 3' está a 125 pb de la secuencia de ovoalbúmina localizada inmediatamente en posición 3' del codón de terminación de la traducción de ovoalbúmina, y tiene la secuencia siguiente:

5'-aaagaagaagctgaaaaactctgtccctccaacaagaccagagcactgtagtcatcaggggtaaatgaaaagtatgt

tatctgctgcatccagacttcataaaaagctggagcttaactctaga-3' (SEQ ID N° 20)

- 25 El brazo de homología de Ov de 3' se obtiene en forma de un producto de PCR de 152 pb amplificado a partir del ADN genómico de pollo o ADN de Ov clonado mediante el uso de los cebadores siguientes:

NotI OV (3'TAA)-F 5'-AAAAGCGGCCGCAAGAAGAAAGCTGAAAAAC-3' (SEQ ID N° 21)

3'OVTAA-R2 5'-CTCCGCGGCTCGAGTCTAGATTAAGCTCCAGCTT-3' (SEQ ID N° 22)

- 30 Tras la amplificación de los fragmentos de homología de 5' y 3', se clonan los productos de PCR en un vector plasmídico tal como pBluescript, y se confirman mediante secuenciación. Después, los brazos de homología se colocan a cada lado del casete de MAb; el brazo de homología de Ov de 5' se coloca en el lado 5' del gen IgL y el brazo de homología de Ov de 3' se coloca en el lado 3' del gen IgH. La inserción del casete de MAb en el OvBAC mediante recombinación homóloga da como resultado la delección del gen estructural Ov. La estructura final del casete de MAb para la selección en el Ov BAC también se muestra en la Figura 17.

- 35 Es necesario un marcador seleccionable, tal como un gen que codifica resistencia a kanamicina, para la selección de recombinantes homólogos en la *E. coli* que alberga OvBAC tras la transformación con el casete de MAb. Así, el vector de selección también contiene un gen de resistencia a kanamicina flanqueado por sitios FRT. Por ejemplo, se libera un casete FRT-Kan de 1,5 Kb de pIGCN21 (un vector que contiene el casete IRES-eGFPcre-FRT-kan-FRT, obtenido del laboratorio de Neal Copeland en el NCI) mediante Xma I y Bgl I (Nt4644-6131), y se hacen romos los extremos. Este fragmento se inserta después en el sitio Not I como en el casete de MAb flanqueado por brazos de
- 40 homología de Ov. El vector de selección se somete a electroporación en bacterias que portan el OvBAC de tipo natural, y se seleccionan las colonias resistentes a kanamicina. La selección correcta se estudia mediante cartografía de restricción de los clones. La mayoría de las colonias resistentes a kanamicina deberían seleccionarse correctamente. El casete de resistencia se elimina después mediante la expresión transitoria de FLP recombinasa
- 45 mediante inducción con arabinosa del gen FLP en la cepa EL250, lo que da como resultado OvBAC-anti-IL-2R α . Se criban los clones sensibles a kanamicina y se verifican mediante cartografía de restricción.

Para la selección de las células PGC transformadas con BAC, se añade después un marcador seleccionable activo en PGCs al BAC. Se ha usado el gen de resistencia a puromicina controlado por el promotor de ERNI para obtener

líneas de PGCs transformadas de manera estable. ERNI es un gen expresado de manera específica en embriones de pollo tempranos, de forma que el marcador ERNI-puro no se expresará en los pollos transgénicos adultos. También se ha descubierto que al flanquear el marcador seleccionable con el elemento aislador del locus de β -globina de pollo se incrementó el número de colonias de PGCs obtenidas tras la transfección. Este elemento, denominado HS4, se clona así a cada lado de ERNI-puro. Se añade HS4-ERNI-puro al BAC mediante actualización del diseño (Wang et al., 2001). El OvMAb anti-IL-2R α BAC final se linealiza con Ascl antes de la transfección.

Ejemplo 22: Propiedades químicas de los anticuerpos producidos en clara de huevo de pollos transgénicos (como ilustración solamente)

Las propiedades químicas de los anticuerpos producidos en las células de las glándulas tubulares de pollos transgénicos exhibirán propiedades excepcionales. Véase la solicitud de patente de EE.UU. US20060174362 y (Zhu, L., et al. Nat. Biotech. 23: 1159-1169 2005). De manera específica, el análisis de monosacáridos de los anticuerpos producidos en los pollos quiméricos revela una diferencia en la composición de carbohidratos, y muestra la presencia de residuos de N-acetil glucosamina, residuos de manosa, y un contenido muy bajo de residuos de galactosa. Los pollos transgénicos exhibirán las mismas propiedades.

La mayoría de diferencias en los perfiles de oligosacáridos unidos por N es la presencia elevada de N-glicanos de tipo manosa, la ausencia de fucosa y un contenido muy bajo de residuos de galactosa en el anticuerpo producido en el pollo. Estas propiedades son importantes por varias razones. En primer lugar, no hay pruebas de uniones α 1-3 Gal, que se sabe que son antigénicas. La reducción de las concentraciones de galactosa, en general a niveles menores de aproximadamente un 2%, reduce sustancialmente la antigenicidad que resulta de las uniones que contienen galactosa. En segundo lugar, no hay pruebas de residuos de ácido N-glicolilneuramínico, que también se sabe que son antigénicos. En tercer lugar, el anticuerpo producido en las células de las glándulas tubulares de pollo está sustancialmente exento de residuos de fucosilo, lo que mejora la actividad ADCC de los anticuerpos. En este contexto, sustancialmente exento se define como menor del 0,1 %. En cuarto lugar, el anticuerpo producido en pollos tiene un contenido de manosa elevado, en general mayor del 40%, lo que incrementa la velocidad de aclaramiento de este anticuerpo al estudiar el aclaramiento en ratones Balb/c mediante el uso del anticuerpo producido en una célula CHO como estándar. Junto con estas propiedades químicas ventajosas, se espera que los anticuerpos estén presentes en la clara de huevo a concentraciones que no se observan con los transgenes que se integran de manera aleatoria en el genoma de pollo o que no se expresan de una manera específica de tejido. Las concentraciones preferidas son mayores de un mg de anticuerpo por huevo, mayores de 2 mg por huevo, mayores de 3 mg por huevo, y hasta 6 mg por huevo. Debido a que cada huevo comprende aproximadamente 25 ml de clara de huevo, las concentraciones preferidas son mayores de 40 μ g/ml, mayores de 80 μ g/ml, mayores de 120 μ g/ml, y hasta 240 μ g/ml.

Para extraer y purificar el anticuerpo de la clara de huevo, primero se mezcla la clara de huevo a baja velocidad de cizalladura durante 30 min a temperatura ambiente, y después se precipita la ovomucina mediante un método modificado descrito previamente. Se añade un volumen de suspensión de clara de huevo homogeneizada a tres volúmenes de agua de ósmosis inversa y se agita durante 30 min. La suspensión diluida se ajusta a pH 6,0 mediante el uso de ácido fosfórico 0,5 M y después se centrifuga durante 20 min a 12.100 g. El sobrenadante se ajusta a pH 7,4 mediante el uso de fosfato sódico dibásico 0,5 M y a una concentración de cloruro sódico 150 mM con sal cristalina. La IgG humana se purifica en una columna de Proteína A-Sepharose FF (Amersham Biosciences) a un caudal lineal de 120 cm/h. La IgG humana adsorbida se lava con cinco volúmenes de columna del tampón de carga (PBS, pH 7,4) y después se eluye con ácido fosfórico 3 mM. La fracción de IgG humana eluida se ajusta a pH 7,5 mediante el uso de fosfato sódico 60 mM (pH 7,5) que contiene NaCl 230 mM para alcanzar una concentración final de fosfato sódico 40 mM y NaCl 150 mM. Después la muestra se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 μ m (Pall).

Ejemplo 23: Ensayo de la afinidad de unión (como ilustración solamente)

Se usó PSMA sobre células LNCaP (ATCC) como antígeno para ensayar la unión. Se incubaron doscientas mil células/pocillo por duplicado durante 30 minutos con alícuotas de 50 μ l de anticuerpo a las concentraciones indicadas. Las células se lavaron dos veces antes de la adición de anticuerpo de cabra marcado con PE anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch) a una dilución 1:200, 50 μ l /pocillo durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces en PBS con un 1% de BSA y se ensayaron mediante FACS. Se determinaron los valores de CE₅₀ de la unión de MAb a PSMA sobre células LNCaP a partir de las curvas de unión mediante la utilización de GraphPad Prism 3.0 (programa informático GraphPad). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con un 10% de FBS, HEPES 10 mM, L-glutamina 2 mM, y piruvato sódico 1 mM. La propiedad de unión al antígeno del MAbF1 producido en las células de las glándulas tubulares de pollo se comparó con la del MAbF1 producido en células CHO. Ambas preparaciones de anticuerpo produjeron curvas de unión prácticamente idénticas a PSMA expresado sobre células LNCaP con valores similares de CE₅₀. Los datos demuestran que aunque los anticuerpos obtenidos de pollo y los obtenidos de CHO están glicosilados de manera diferente, reconocen y se unen al antígeno de manera equivalente.

Ejemplo 24: Ensayo de interiorización de anticuerpos (como ilustración solamente)

La unión del MAbF1 a PSMA conduce a la interiorización del anticuerpo. En una aplicación potencial, se podría conjugar MAb con citotoxinas para seleccionar como objetivo y destruir células tumorales que expresan PSMA. La interiorización del anticuerpo que se une a PSMA sobre las células LNCaP se determinó incubando las células con MAb y Hum-Zap (Advanced Targeting Systems). HumZap es un anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado a la proteína inactivante de ribosomas, saporina. Las células se destruyen cuando el complejo MAbF1/Hum-Zap se une a PSMA en la superficie celular y se interioriza, mientras el anticuerpo o Hum-Zap por sí solos no son tóxicos para las células LNCaP. Se incubaron células LNCaP (10.000 / pocillo) por triplicado, durante 48 horas, a 37 °C, en 150 µl de medio de cultivo que contenía 300 ng de Hum-Zap, y 300 ng de MAb F1, o MAb de control. Se determinó la proliferación celular y la supervivencia con el Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo (Promega). También se realizaron ensayos de interiorización incubando diluciones de anticuerpo en medio de cultivo celular con 10.000 células LNCaP adherentes/pocillo, durante 2 horas a 4 °C. Las disoluciones de anticuerpo se retiraron suavemente y se sustituyeron con 150 µl de medio que contenía 200 ng de HumZap. Se determinó la viabilidad celular tras 48 horas de incubación a 37 °C. Se determinaron gráficamente los valores de CE₅₀ para la interiorización del anticuerpo con Prism 3.0 (programa informático GraphPad). Ambas preparaciones de anticuerpos se interiorizan con una eficacia similar. Cuando se ensayó a lo largo de un intervalo de concentraciones de anticuerpo, los valores de CE₅₀ para la interiorización del MAbF1 obtenido de pollo y el obtenido de CHO fueron 0,49 nM.

Ejemplo 25: Aclaramiento de MAb en ratones BALB/c (como ilustración solamente)

Se analizó la semivida *in vivo* del MAbF1 producido en pollo en paralelo con el anticuerpo producido en CHO en ratones BALB/c mediante inyección intravenosa de anticuerpos radiomarcados. Se yodaron ligeramente diez µg de proteína MAb (menos de un l por anticuerpo) con ¹²⁵I mediante el uso del método Iodobead (Pierce). Se alimentó a ratones BALB/c hembra de seis semanas de edad (Taconic Farms, Germantown, NY) con 0,1 mg/ml de yoduro potásico en el agua de bebida durante una semana antes del experimento. Se inyectaron aproximadamente 600.000 cpm de MAb marcado de manera intravenosa a cuatro ratones por proteína en la vena de la cola, y se midió la radiactividad del cuerpo completo en momentos seleccionados mediante el uso de un contador gamma de cuerpo completo (detector de cristal de NaI Wm. B. Johnson con un contador Ludlum). Se calculó la semivida mediante análisis de regresión exponencial de la radiactividad residual. El MAbF1 producido por las células de las glándulas tubulares de pollo se eliminó con una semivida (*t*_{1/2}) de 102,4± 0,9 horas, mientras los MAbF1 producidos por las células CHO se eliminó más lentamente, con una semivida de 207,5±18,3 horas.

Ejemplo 26: Ensayo de ADCC (como ilustración solamente)

Se ensayaron células LNCaP-C42B en un ensayo modificado de ADCC con ⁵¹Cr. Se purificaron células mononucleares de sangre periférica humana a partir de sangre completa heparinizada mediante separación estándar con Ficoll-paque. Las células se resuspendieron (a 1x10⁶ células / mL) en medios RPMI1640 que contenían un 10% de FBS y 10 U/ml de IL-2 humana, y se incubaron durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, se recogieron las células y se lavaron una vez en medio de cultivo y se resuspendieron a 2 x 10⁷ células /ml. Se incuban dos millones de células objetivo LNCaP-C42b con 200 µCi de ⁵¹Cr en un volumen total de 1 ml durante 1 hora a 37 °C. Las células objetivo se lavan una vez, se resuspenden en 1 ml de medio, y se incuban a 37° C durante otros 30 minutos. Tras la incubación final, las células objetivo se lavan una vez y se llevan hasta un volumen final de 1x10⁵ células/ml. Para el ensayo final de ADCC, se incuban 100 µl de células LNCaP marcadas con 50 µl de células efectoras y 50 µl de anticuerpo. Se seleccionó la proporción 1:100 de objetivo final respecto de efector. En todos los estudios, se analiza un control de isotipo de IgG1 humano y se compara con el anticuerpo MAbF1 anti-PSMA obtenido de CHO. Otros controles que se incluyen son: a) células objetivo y efectoras pero sin anticuerpo, b) células objetivo sin células efectoras y c) células objetivo y efectoras en presencia de un 3% de Triton X-100. Después de una incubación de 4 horas a 37° C, se recogieron los sobrenadantes y se contaron en un contador gamma (Cobra II auto-gamma de Packard Instruments) con una ventana de lectura de 240-400 keV. Las cuentas por minuto se representaron como una función de la concentración de anticuerpo, y los datos se analizaron mediante regresión no lineal, dosis-respuesta sigmoidea (pendiente variable) mediante el uso del programa informático Prism (San Diego, CA). EL porcentaje de lisis se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Lisis} = (\text{CPM de la Muestra} - \text{CPM sin anticuerpo}) / (\text{CPM con TritonX} - \text{CPM sin anticuerpo}) \times 100$$

Se monitorizan los valores de CE₅₀ y del % de Lisis en todos los estudios. Por ejemplo, es posible cuando se comparan dos anticuerpos que exista un cambio en el CE₅₀ o el % de lisis, o ambos.

Se llevó a cabo un bloqueo de ADCC con anticuerpos anti-CD16 con las modificaciones siguientes. Las células se incubaron con 1 o 0,01 µg/ml de anticuerpos MAbF1 producidos en CHO o producidos en pollo en ausencia o presencia de 5 µg/ml del anticuerpo anti-CD16 3G8 o de anticuerpo de control de isotipo.

El MAb obtenido de CHO induce una lisis celular dependiente de la dosis, que alcanza una meseta a un 38% de lisis con un CE₅₀ de 0,11 µg/ml con células efectoras estimuladas con IL-2. En contraste, el MAb obtenido de huevo de pollos fue más potente y más eficaz. El % de lisis máximo del MAb obtenido de huevo de pollos fue del 60% con dos preparaciones diferentes del anticuerpo. También se demostró la potencia incrementada respecto del MAb obtenido

de CHO, ya que el CE_{50} de este material fue 0,018 $\mu\text{g/ml}$. Finalmente, como se esperaba, el anticuerpo de control de isotipo no indujo la lisis celular. La ADCC con células efectoras sin estimular (PBMCs recientes) muestra una diferencia mayor en los valores de CE_{50} , pero una destrucción celular total inferior.

5 CD16 (FCgRIII) es un receptor clave que actúa como mediador en la ADCC. La especificidad de la respuesta de ADCC se mostró bloqueando la interacción de las células objetivo y efectoras mediante el uso de un anticuerpo monoclonal dirigido hacia CD16. En este estudio se usaron dos dosis de anticuerpo MAbF1, una dosis saturante (1 $\mu\text{g/ml}$) y una dosis sub-óptima (0,01 $\mu\text{g/ml}$). Un $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo MAbF1, en ausencia de anticuerpo anti-CD16, indujo aproximadamente un 15% y 38% de lisis con anticuerpo obtenido de CHO y obtenido de pollo, respectivamente. Este % de lisis se redujo al ~4% en presencia de anticuerpo anti-CD16, mientras el anticuerpo de control de isotipo no tuvo efecto.

Ejemplo 27: Unión a CD16 (como ilustración solamente)

15 Se inmovilizaron MAbF1s obtenidos de CHO y pollo en la superficie de una matriz de carboximetil dextrano de un chip sensor de Biacore (CM5) por medio de aminas primarias, mediante el uso de un kit de acoplamiento de aminas proporcionado por Biacore. Ambos anticuerpos se revistieron a una densidad de alrededor de 10.000 URs. La unión de los dos anticuerpos con CD16-Phe y CD16-Val se llevó a cabo haciendo fluir varias concentraciones de las proteínas sobre las superficies con anticuerpo inmovilizado. Se tuvo en cuenta el efecto de la unión inespecífica considerando las superficies tratadas con un blanco y ciclos de unión con tampón solamente. Se usó tampón HBS-EP para las diluciones y como tampón de análisis. El experimento se llevó a cabo a 25 °C en un instrumento Biacore-3000. Los datos se analizaron mediante el uso del programa informático GraphPad Prism, y los datos se ajustaron respecto de un modelo de sitio de unión único para calcular la constante de disociación en equilibrio.

20 La constante de disociación se calculó basándose en experimentos de unión en equilibrio en vez de en las constantes de velocidad, ya que la cinética rápida es una característica distintiva de la unión de FcRs a anticuerpos. La constante de disociación, K_D , del anticuerpo obtenido de pollo es alrededor de diez veces inferior para ambos FcRs, en comparación con el anticuerpo obtenido de CHO correspondiente. La afinidad superior del anticuerpo obtenido de pollo se puede atribuir a las diferencias de glicosilación en la región Fc, especialmente debido a la ausencia de fucosa, que está presente en el anticuerpo obtenido de CHO.

Ejemplo 28: Utilidad terapéutica (como ilustración solamente)

30 Se proporcionan anticuerpos que tienen patrones de glicosilación definidos de manera específica y otras propiedades químicas, y que se han generado mediante el uso del pollo modificado genéticamente descrito anteriormente. Estas propiedades proporcionan propiedades terapéuticas mejoradas cuando se administran a un paciente con el fin de unirse a objetivos con antígenos específicos en el tejido objetivo. De manera específica, como se indicó anteriormente, para ciertas indicaciones clínicas, los anticuerpos exhiben una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementada, y este efecto ofrece ventajas importantes en ciertas indicaciones clínicas.

35 Los ensayos clínicos de anticuerpos monoclonales (mAbs) sin conjugar para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer han producido resultados alentadores. Dillman, 1997, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12:223-225; Deo et al., 1997, *Immunology Today* 18:127. Se ha aprobado una IgG1 quimérica, sin conjugar, para el linfoma no Hodgkin de células B en grado bajo o folicular (Dillman, 1997, anteriormente mencionado), mientras otro mAb sin conjugar, una IgG1 humanizada que selecciona como objetivo tumores de mama sólidos, también ha mostrado resultados prometedores en ensayos clínicos de fase III. Deo et al., 1997, anteriormente mencionado. Los antígenos de estos dos mAbs se expresan a niveles elevados en su tejido objetivo respectivo. Para tales aplicaciones, en particular en células tumorales en las que los anticuerpos actúan como mediadores en la destrucción tumoral potente mediante ADCC, los anticuerpos ofrecen ventajas terapéuticas tras la administración a un paciente.

45 Para los usos terapéuticos, también se puede unir funcionalmente un anticuerpo (p.ej., mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como otro anticuerpo (p.ej., para producir un anticuerpo biespecífico o multiespecífico), una citotoxina, un ligando celular o un antígeno (p.ej., para producir un inmunoc conjugado, tal como una inmunotoxina). Un anticuerpo se puede unir a otros restos terapéuticos, p.ej., un radioisótopo, un fármaco antineoplásico de molécula pequeña, un agente antiinflamatorio, una citotoxina o un agente inmunosupresor. Las composiciones de anticuerpos que tienen propiedades químicas proporcionadas por el sistema de expresión en pollos y combinadas con básicamente toda la conjugación conocida de anticuerpos, unión, y técnicas relacionadas pueden tener uso terapéutico.

50 Los anticuerpos se pueden usar para tratar y/o prevenir una diversidad de enfermedades que implican células que expresan un antígeno en un tejido objetivo que es susceptible de tratamiento, en particular cuando se exhibe un mecanismo de ADCC en el tejido objetivo. Las enfermedades ejemplares que se pueden tratar (p.ej., mejorar) o prevenir incluyen, pero sin limitación, tumores sólidos, linfomas, tumores difusos, y tejidos cancerosos de todos los tipos.

55 En un uso terapéutico, se administra a un paciente el anticuerpo de manera específica de acuerdo con un diagnóstico de una afección que se trataría mediante una modalidad que exhibe la propiedad de ADCC. En tal

entorno clínico, se administran los anticuerpos y el efecto citotóxico celular del tratamiento se determina tras el tratamiento, para determinar el efecto de ADCC en el tejido objetivo. Además de las composiciones terapéuticas, se puede tratar adicionalmente al paciente con un agente quimioterápico, radiación, o un agente que modula, p.ej., aumenta o inhibe, la expresión de la actividad de un receptor Fc, tal como una citocina. En general, las citocinas para la administración durante el tratamiento incluyen el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón- γ (IFN- γ), y factor de necrosis tumoral (TNF). Los agentes terapéuticos típicos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como doxorubicina, cisplatino, bleomicina, carmustina, clorambucilo, y ciclofosfamida.

Se puede proporcionar una composición, p.ej., una composición farmacéutica que contiene uno o una combinación de los anticuerpos expresados en pollo descritos en la presente memoria. Se puede administrar una composición mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el técnico experto, la vía y/o el modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles, y el uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Se pueden preparar disoluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes, seguido de esterilización y/o microfiltración. En general, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y cualquier otro ingrediente.

Los regímenes de dosis se ajustan para proporcionar el efecto de ADCC deseado óptimo. Por ejemplo, se puede administrar una única inyección rápida, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo, o la dosis se puede reducir o incrementar de manera proporcional, tal como lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en una forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de las dosis. La forma farmacéutica unitaria, como se usa en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente discretas que son adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario. Las especificaciones para las formas farmacéuticas unitarias de la invención están impuestas por, y son directamente dependientes de, (a) las características excepcionales del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a alcanzar, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición de tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en los pacientes.

Los niveles de dosis concretos de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición, y modo de administración, sin que sean tóxicos para el paciente. El nivel de dosis seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos, que incluyen la actividad de las composiciones particulares empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular a emplear, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, afección, salud general e historia médica anterior del paciente a tratar, y factores similares muy conocidos en las técnicas médicas.

Debido a que el efecto de la administración de los anticuerpos es observable objetivamente en el tejido objetivo, tal como un tumor, los métodos terapéuticos incluyen diagnosticar a un paciente que necesita terapia, lo que incluye específicamente una terapia que usa la ADCC, identificar un tejido objetivo en el que se desea el efecto, administrar las composiciones al paciente que lo necesita, y medir el efecto terapéutico en el paciente, tal como determinando la eficacia de la ADCC en el tejido objetivo del paciente. La determinación del efecto terapéutico se puede llevar a cabo analizando los cambios en las propiedades del tejido objetivo a lo largo del tiempo, tal como la muerte celular, la disminución del tejido objetivo, las reducciones del tamaño tumoral, y cualquier otra técnica de diagnóstico conocida en las técnicas médicas.

Los anticuerpos se pueden ensayar también en cuanto a la actividad de ADCC en cualquiera de varios modelos conocidos de ADCC disponibles para los expertos en la técnica. Con el fin de determinar la utilidad de los presentes anticuerpos para uso terapéutico o diagnóstico, la medida de la ADCC se puede llevar a cabo independientemente o en comparación con otros sistemas de expresión en células mamíferas, no mamíferas, vegetales, o bacterianas. Por lo tanto, los métodos incluyen determinar la diferencia de utilidad con el fin de llevar a cabo la ADCC mediante el uso de un anticuerpo en comparación directa o indirecta con otro anticuerpo producido en los sistemas anteriormente mencionados. De manera específica, esta metodología incluye comparar el efecto de ADCC de los anticuerpos producidos en el sistema de expresión en pollos descrito anteriormente para identificar la ADCC incrementada, para identificar los anticuerpos candidatos ideales para el sistema de expresión en pollos.

Como se indicó anteriormente, para aumentar la utilidad terapéutica, los anticuerpos se pueden coadministrar con uno o más agentes terapéuticos, p.ej., un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo puede estar unido al agente (en forma de un inmunocomplejo) o se puede administrar por separado del agente. En este último caso (administración por separado), el anticuerpo se puede administrar antes, después o al mismo tiempo que el agente, o se puede coadministrar con otras terapias conocidas, p.ej., una terapia antineoplásica, p.ej., radiación. Tales agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como

doxorubicina, cisplatino, bleomicina, carmustina, clorambucilo, y ciclofosfamida. La coadministración de los anticuerpos con agentes quimioterápicos proporciona dos agentes antineoplásicos que funcionan por medio de mecanismos diferentes, lo que produce un efecto citotóxico en las células tumorales humanas. Tal coadministración puede resolver problemas debidos al desarrollo de resistencia a fármacos o a un cambio en la antigenicidad de las células tumorales, lo que las haría insensibles al anticuerpo.

5

Listado de secuencias

- <110> Origen Therapeutics
Van de Lavoir, Marie-Cecile
Leighton, Philip
- 5 <120> Pollos Transgénicos
<130> 700603.4007
<140> todavía sin asignar
<141> 01-02-2006
- 10 <150> 11/204/879
<151> 15-08-2000
<150> 11/049,229
<151> 01-02-2005
<160> 22
<170> PatentIn versión 3.2
- 15 <210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial V-1
<220>
<223> Cebador para amplificar un fragmento de 751 pb del transcrito de CVH
<400> 1
gctcgatag ggttttgat 20
- 25 <210> 2
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial V-2
<220>
<223> Cebador para amplificar un fragmento de 751 pb del transcrito de CVH
<400> 2
- 30 ttctctggg ttccattctg c 21
<210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial Dazl-1
- 35 <220>
<223> Cebador para amplificar un fragmento de 536 pb del transcrito de Dazl
<400> 3
gcttgcacgc ttttctgct 20
- 40 <210> 4
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial Dazl-2
<220>
<223> Cebador para amplificar un fragmento de 536 pb del transcrito de Dazl
- 45 <400> 4
tgcgtcaca agttaggca 19

ES 2 615 081 T3

<210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial Act-RT-1

 <220>
 <223> Cebador para amplificar un fragmento de 597 pb del transcrito de actina de pollo

 <400> 5

 aacaccccag ccatgtatgt a 21

 10 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial Act-RT-2

 <220>
 15 <223> Cebador para amplificar un fragmento de 597 pb del transcrito de actina de pollo

 <400> 6

 tttcattgtg ctaggtgcca 20

 <210> 7
 <211> 28
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial HS4-Bam-F

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 7

 25 aggatccgaa gcaggcttc ctggaagg 28

 <210> 8
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial HS4-Bgl-R

 30 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 8

 aagatctca gcctaaagct tttcccgt 30

 <210> 9
 35 <211> 136
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial Oligo 1

 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico para el gen V de la cadena ligera

 40 <400> 9

 ctctctagac aactcagagt tcaccatgga gaccgatacc ctcttgctat gggtcctcct 60
 gctatgggtc ccaggatcaa ccggagatat tcagatgacc cagtctccat ctaccctctc 120
 tgctagcgtc ggggat 136

 <210> 10
 <211> 114
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial Oligo 2

ES 2 615 081 T3

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico para el gen V de la cadena ligera
 <400> 10
 ataaattaga agcttgggag ctttgcctgg cttctgctgg taccagtgca tgtaacttat 60
 acttgagctg gcagagcagg ttatggtgac cctatccccg acgctagcag agag 114

5 <210> 11
 <211> 123
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial Oligo 3

<220>
 10 <223> Cebador oligonucleotídico para el gen V de la cadena ligera
 <400> 11
 gctccaagc ttctaattta taccacatcc aacctggctt ctggagtccc tgctcgcttc 60
 agtggcagtg gatctgggac cgagttcacc ctcacaatca gctctctgca gccagatgat 120
 ttc 123

<210> 12
 <211> 127
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial Oligo 4

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico para el gen V de la cadena ligera
 <400> 12
 ctgcgatcg ccaatagtga aaaattacgt ttgacctca ccttggctcc ctgaccgaac 60
 gtgagtgggt aagtactcct ttgatggcag taataagtgg cgaaatcatc tggctgcaga 120
 gagctga 127

20 <210> 13
 <211> 95
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial Oligo 5

25 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico para el gen V de la cadena pesada
 <400> 13
 ctctcggat ctctctgttc acaggcgtgc actctcaggt ccagcttgtc cagtctgggg 60
 ctgaagtcaa gaaacctggc tcgagcgtga aggtc 95

30 <210> 14
 <211> 129
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial Oligo 6

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico para el gen V de la cadena pesada

35 <400> 14
 cccagtgcac ggattaatat atccaatcca ttccagacc tgtccagggg cctgccttac 60
 ccagtgcac ctgtagctag taaaggtgta gccagaagcc ttgcaggaga cttcacgct 120
 cgagccagg 129
 <210> 15

ES 2 615 081 T3

<211> 124
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial Oligo 7
 <220>
 5 <223> Cebador oligonucleotídico para el gen V de la cadena pesada
 <400> 15
 tatattaatc cgtcgactgg gtatactgaa tacaatcaga agttcaagga caaggcaaca 60
 attactgcag acgaatccac caatacagcc tacatggaac tgagcagcct gagatctgag 120
 gaca 124
 <210> 16
 <211> 121
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial Oligo 8
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico para el gen V de la cadena pesada
 <400> 16
 ctctcgcgag gccattctta cctgaggaga ctgtgaccag ggttccttgg cccagtagt 60
 caaagacccc cccccctctt gcacagtaat agactgcggt gtcctcagat ctcaggctgc 120
 15 t 121
 <210> 17
 <211> 125
 <212> ADN
 <213> Gallus sp.
 20 <220>
 <221> característica_misc
 <223> Fragmento HincII-XbaI en posición 5' de la secuencia Kozak de inicio de la traducción de OV en el gen de ovoalbúmina
 <400> 17
 gttaacattt aattgcctaa aaactgctcg taatttactg ttgtagccta ccatagagta 60
 ccctgcatgg tactatgtac agcattccat ccttacattt tcaactgttct gctgtttgct 120
 25 ctaga 125
 <210> 18
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Cebador Oligonucleotídico K8 HincII-F
 <400> 18
 ggatatagca acagacacat tac 23
 <210> 19
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador Oligonucleotídico K8-TTT NotIXbaI-R
 40 <400> 19

ES 2 615 081 T3

```

ttgcggccg ctctagagca aacagcagaa c      31
<210> 20
<211> 125
<212> ADN
5 <213> Gallus sp.

<220>
<221> característica_misc
<223> Brazo de homología de OV de 3' localizado en posición 3' del codón de terminación de la traducción del gen
de ovoalbúmina

10 <400> 20

aaagaagaaa gctgaaaaac tctgtccctt ccaacaagac ccagagcact gtagtattcag      60
gggtaaaatg aaaagtatgt tatctgctgc atccagactt cataaaagct ggagcttaat      120
ctaga                                          125

<210> 21
<211> 32
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleotídico NotI OV (3'TAA)-F

<400> 21

aaaagcgcc gcaaagaaga aagctgaaaa ac      32

20 <210> 22
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
25 <223> Cebador oligonucleotídico 3' OVTAA-R2

<400> 22

ctccgggct cgagtctaga ttaagctca gctt      34

```

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un pollo transgénico que comprende:
 - 5 incorporar un transgén en el genoma de una célula germinal primordial (PGC), obtenida cultivando sangre completa de un embrión de pollo en etapa 12 a 17 en medios acondicionados con células de hígado de rata Buffalo (BRL) y que contienen factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de células madre, suero de pollo y células de soporte que no son de pollo, en el que el transgén comprende una secuencia de ADN exógena que codifica una proteína farmacéutica y está flanqueada por al menos un aislador, y de ese modo se produce una PGC transformada;
 - 10 seleccionar una PGC transformada clonal cuyo genoma comprende y expresa de manera estable el transgén;
 - insertar la PGC en un pollo receptor,
 - eclosionar un pollo quimérico del embrión, en el que el pollo quimérico comprende una célula de la línea germinal obtenida de la PGC transformada clonal que comprende y expresa de manera estable el transgén; y
 - criar el pollo quimérico para producir un pollo transgénico, en el que el genoma del pollo transgénico procede de la célula de la línea germinal clonal y comprende y expresa de manera estable el transgén.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que el ADN exógeno es de un tamaño mayor de 10 kb, o mayor de 15 kb.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la proteína farmacéutica es un anticuerpo monoclonal.
4. El método de la reivindicación 1, en el que el transgén comprende una secuencia polinucleotídica humana.
5. El método de la reivindicación 1, en el que al menos un aislador es un aislador HS4.
6. El método de la reivindicación 1, en el que el transgén comprende un marcador seleccionable.
- 20 7. El método de la reivindicación 1, en el que el transgén comprende un elemento de respuesta temprana a inducción neural (ERNI).
8. Un cultivo que comprende al menos 1×10^5 células germinales primordiales (PGCs) clonales de pollo cuyos genomas comprenden y expresan de manera estable una secuencia de ADN exógena que codifica una proteína farmacéutica, en el que las PGCs se obtienen cultivando sangre completa de un embrión de pollo en etapa 12-17 en
 - 25 medios acondicionados con células de hígado de rata Buffalo (BRL) y que contienen factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de células madre, suero de pollo y células de soporte que no son de pollo, en el que las PGCs cultivadas colonizan preferentemente la línea germinal de un embrión receptor, y en el que el transgén está flanqueado por al menos un aislador.
9. El cultivo de la reivindicación 8, en el que el ADN exógeno es de un tamaño mayor de 10 kb, o mayor de 15 kb.
- 30 10. El cultivo de la reivindicación 8, en el que al menos un aislador es un aislador HS4.
11. Un pollo quimérico de la línea germinal que comprende:
 - 35 tejido de la línea germinal colonizado por células germinales primordiales (PGCs) obtenidas de manera clonal y modificadas genéticamente, y dichas PGCs se obtienen cultivando sangre completa de un embrión de pollo en etapa 12 a 17 en medios acondicionados con células de hígado de rata Buffalo (BRL) y que contienen factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de células madre, suero de pollo y células de soporte que no son de pollo, y tejido somático sustancialmente exento de células modificadas genéticamente, en el que los genomas de las PGCs comprenden y expresan de manera estable un transgén que comprende una secuencia de ADN exógena que codifica una proteína farmacéutica, en el que el transgén está flanqueado por al menos un aislador, y en el que el pollo quimérico de la línea germinal es capaz de producir una descendencia transgénica cuyos genomas
 - 40 comprenden y expresan de manera estable el transgén.
12. La quimera de la línea germinal de la reivindicación 11, en la que el ADN exógeno es de un tamaño mayor de 10 kb, o mayor de 15 kb.
13. El pollo quimérico de la línea germinal de la reivindicación 11, en el que la proteína farmacéutica es un anticuerpo monoclonal.
- 45 14. El pollo quimérico de la línea germinal de la reivindicación 13, en el que el anticuerpo monoclonal tiene una secuencia polinucleotídica humana.
15. El pollo quimérico de la línea germinal de la reivindicación 11, en el que al menos un aislador es un aislador HS4.

- 5 16. Una célula germinal primordial (PGC) clonal de pollo cuyo genoma comprende y expresa de manera estable un transgén que comprende una secuencia de ADN exógena que codifica una proteína farmacéutica, y el transgén tiene un promotor de respuesta temprana a inducción neural (ERNI) expresable unido de manera operable a una región codificante del transgén, en el que el transgén está flanqueado por un aislador, y en el que la PGC clonal se obtiene cultivando sangre completa de un embrión de pollo en etapa 12-17 en medios acondicionados con células de hígado de rata Buffalo (BRL) y que contienen factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de células madre, suero de pollo y células de soporte que no son de pollo.
17. La PGC de la reivindicación 16, en la que el aislador es un aislador HS4.

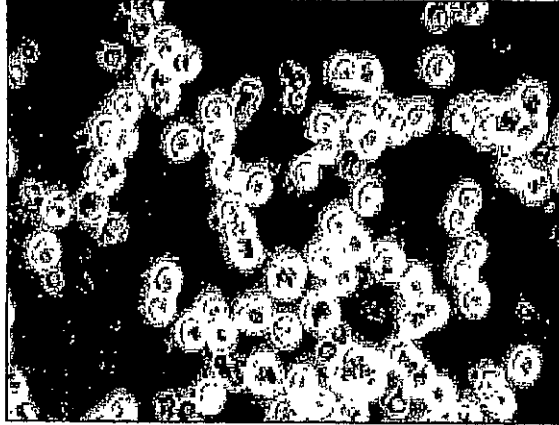


FIGURA 1A

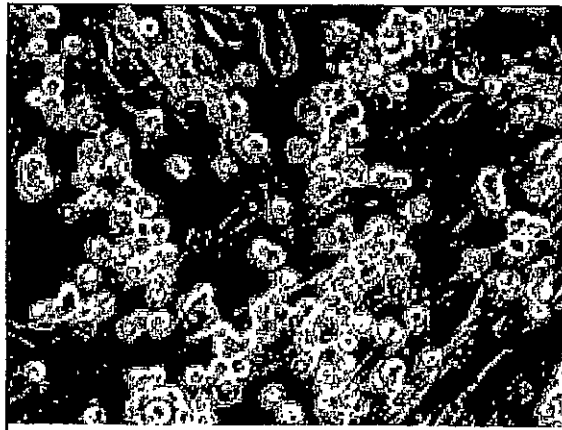


FIGURA 1B

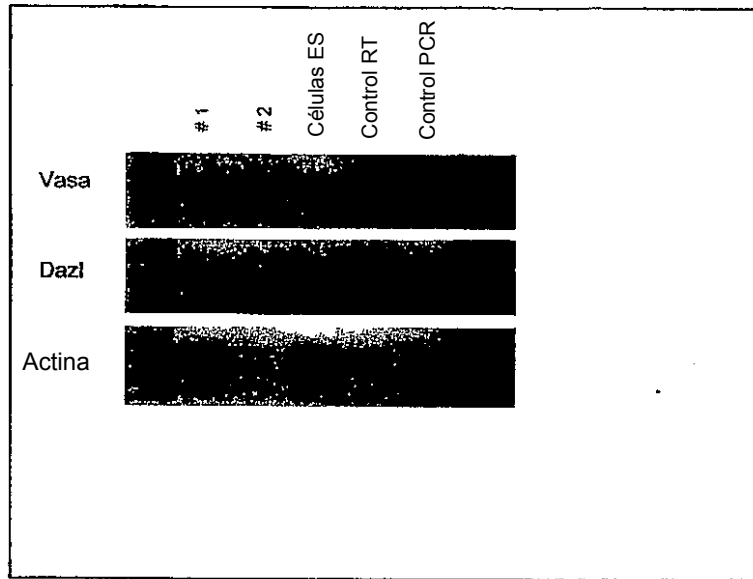


FIGURA 2

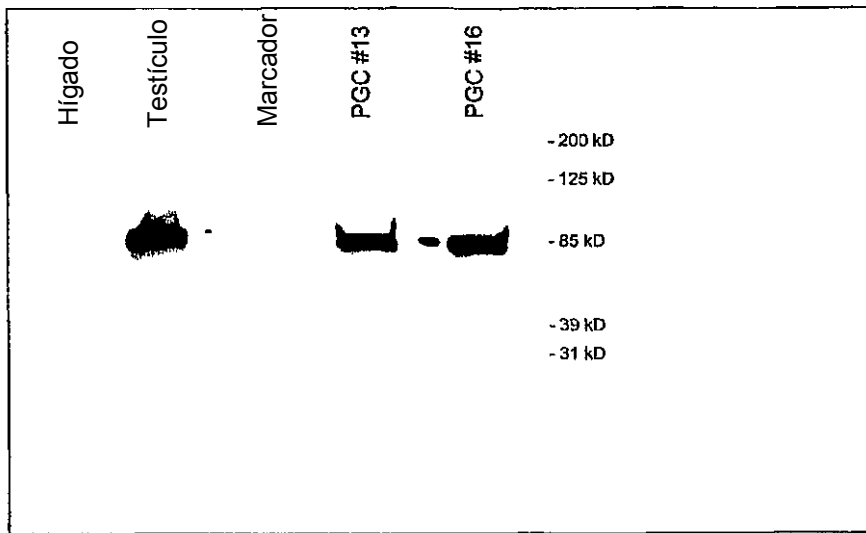


FIGURA 3

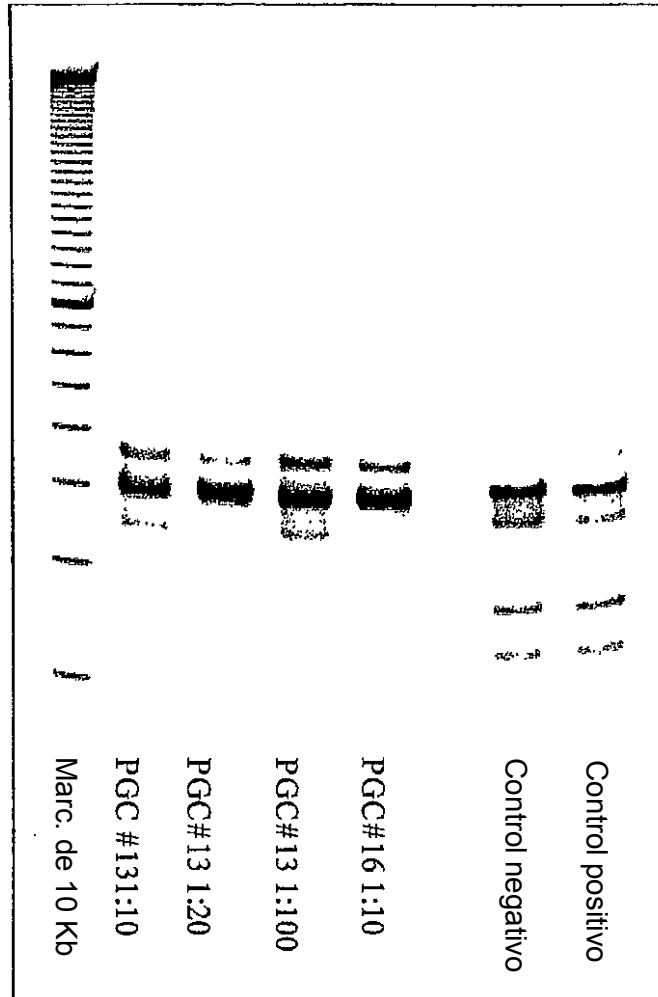


FIGURA 4

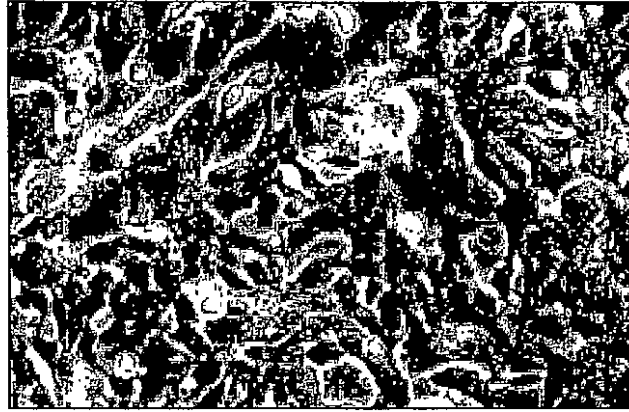


FIGURA 5A



FIGURA 5B



FIGURA 6



FIGURA 7

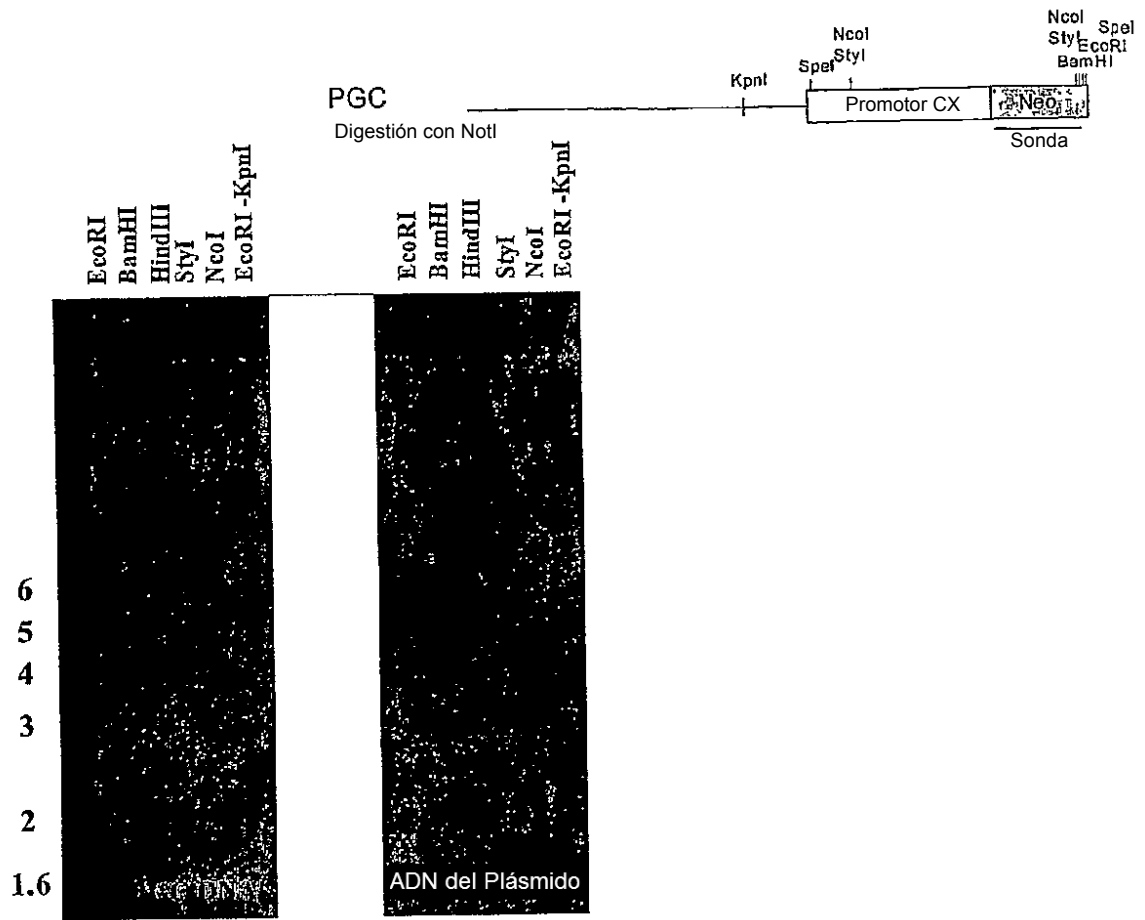


FIGURA 8

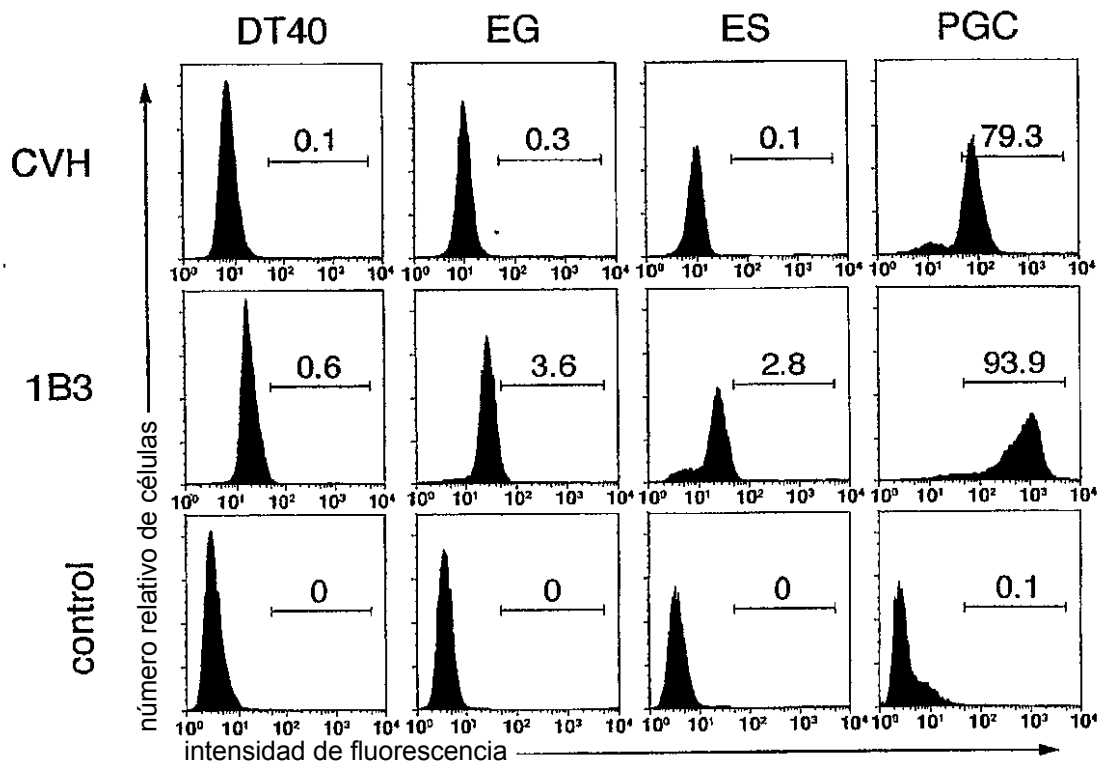


FIGURA 9

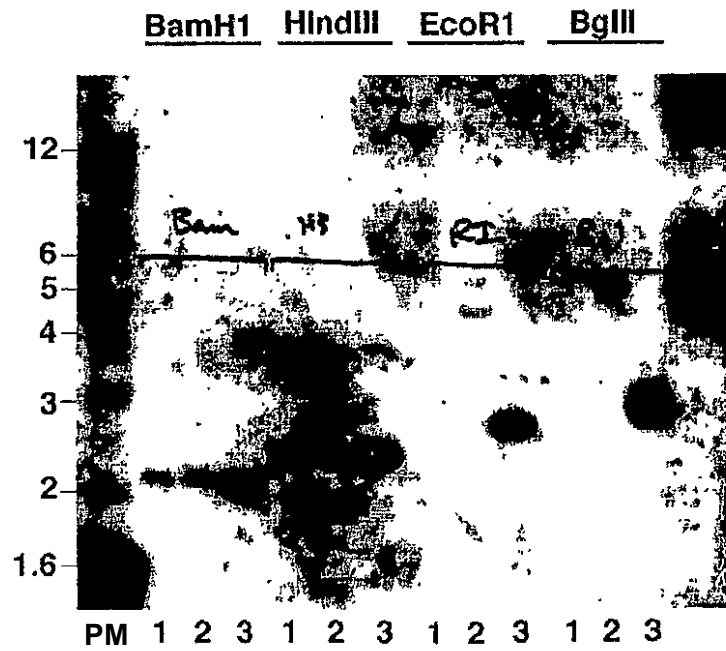
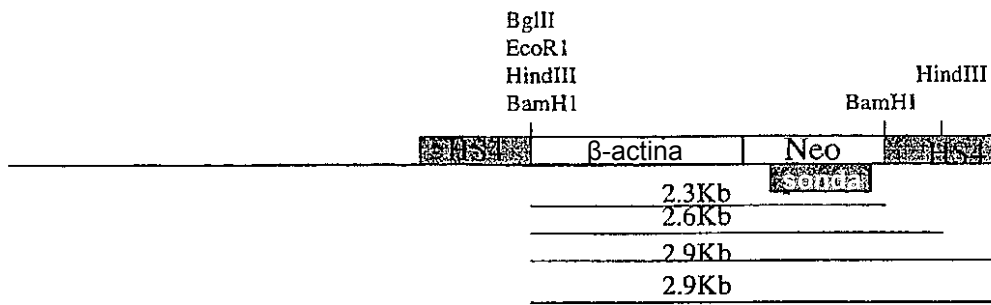


FIGURA 10

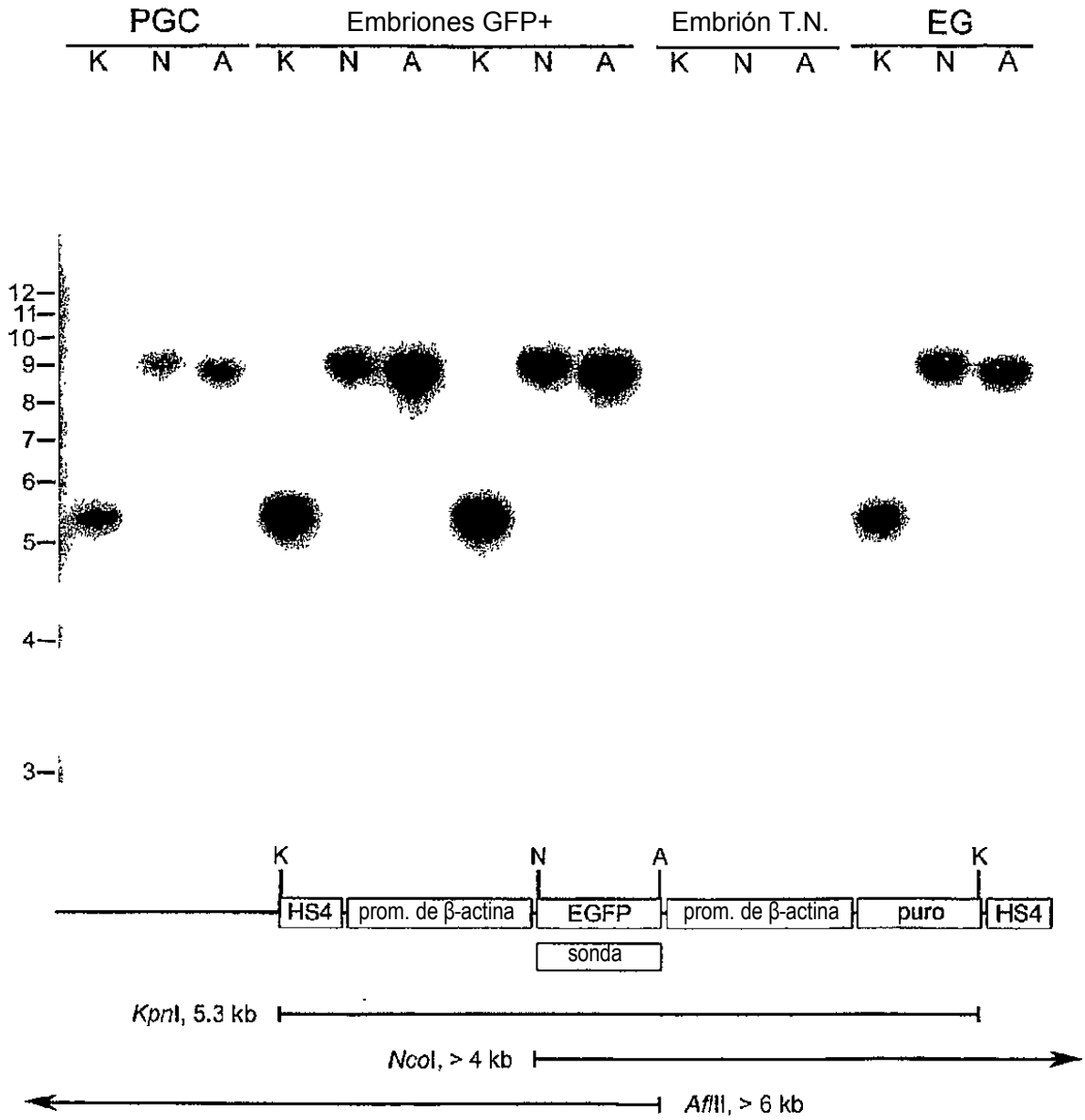


FIGURA 11



FIGURA 12

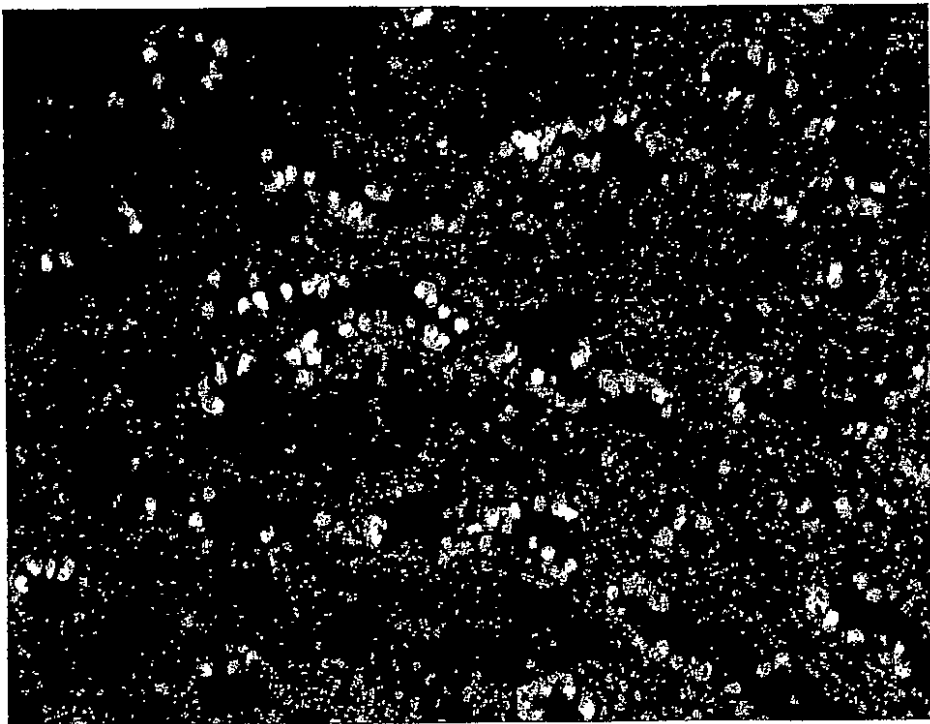


FIGURA 13

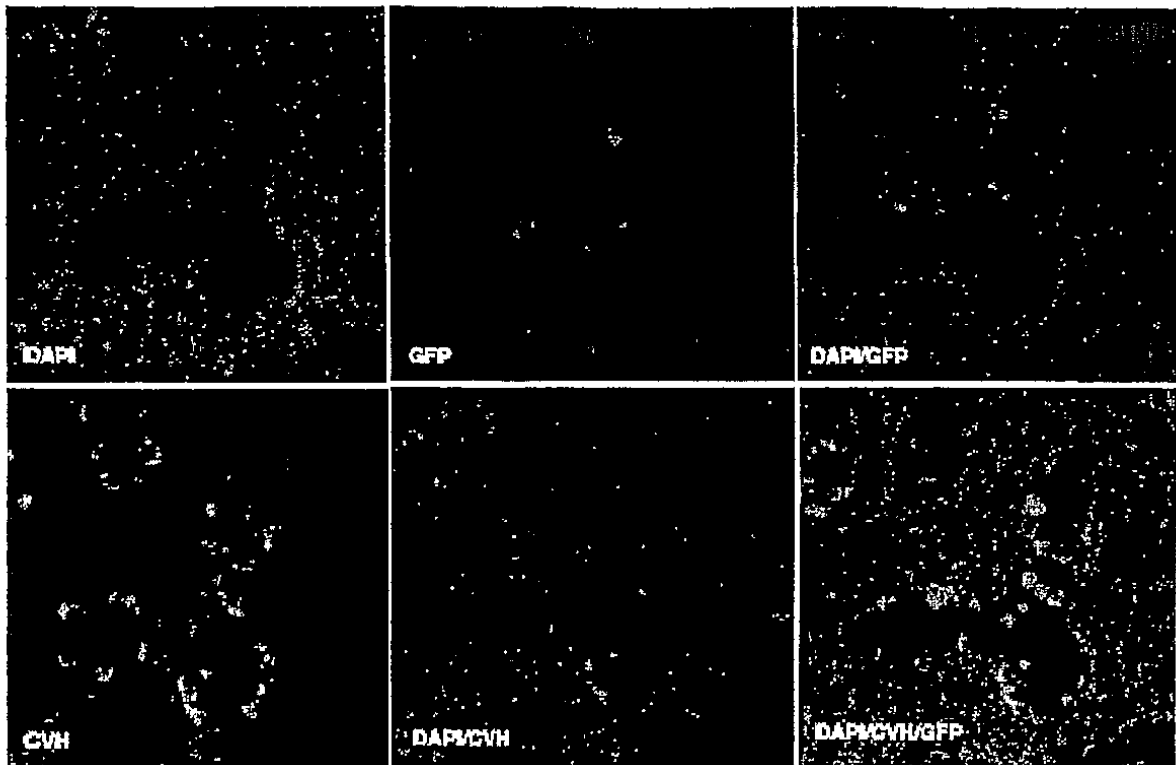


FIGURA 14



FIGURA 15

FIGURA 16

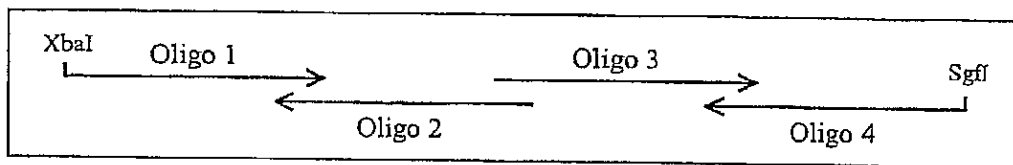


FIGURA 17

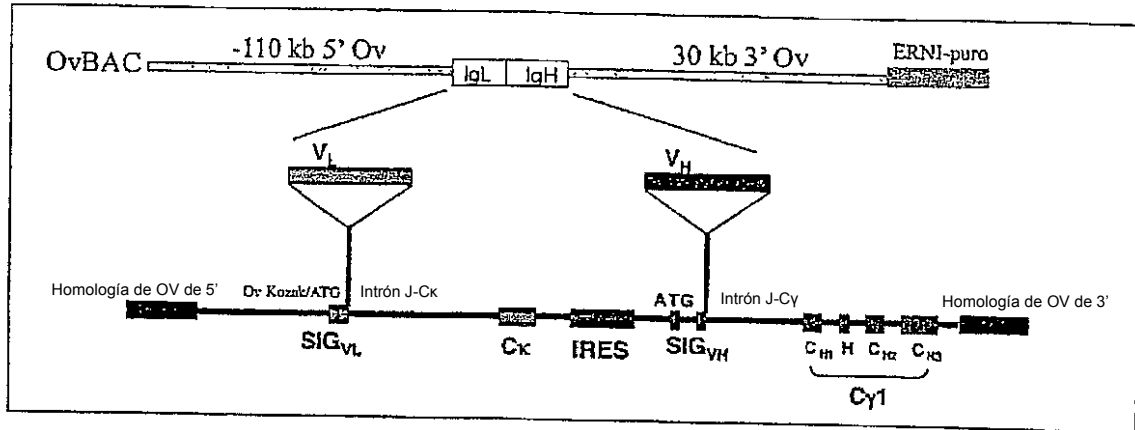


FIGURA 18

