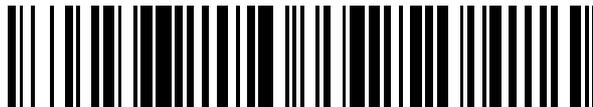


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 344**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/077** (2010.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.07.2014 PCT/EP2014/065946**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015 WO15011238**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2014 E 14742242 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 3024927**

54 Título: **Procedimiento de selección de una línea celular permisiva para la replicación de virus aviares**

30 Prioridad:

**25.07.2013 FR 1357346**

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

**06.04.2018**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE  
AGRONOMIQUE (100.0%)  
147, rue de l'Université  
75007 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**VAUTHEROT, JEAN-FRANÇOIS;  
PAIN, BERTRAND;  
DENESVRE, CAROLINE y  
FRAGNET - TRAPP, LAETITIA**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 662 344 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

Procedimiento de selección de una línea celular permisiva para la replicación de virus aviares.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento de selección de una línea celular permisiva para la replicación de virus aviares, a partir de células madre embrionarias aviares.

10 **Introducción**

Las granjas avícolas están afectadas o bajo la amenaza de varias enfermedades virales, cuyos efectos pueden ser directos (patología inducida por virus) o indirectos (inmunodepresión que establece el lecho para otras infecciones virales, bacterianas o parasitarias).

15

Sin embargo, la vacunación, ampliamente practicada en las principales especies de aves productoras (pollo, pavo, pintada, codorniz, oca, pato, etc.), plantea 2 problemas:

20

- Los costes de producción de las vacunas deben seguir siendo compatibles con una granja que genera solo bajos márgenes de beneficio para el granjero. Aunque el mercado es considerable en cuanto a individuos vacunados (por ejemplo: 44 millones de gallinas ponedoras en Francia en 2011), las vacunas sólo pueden ser comercializadas a unos precios que superan algunos céntimos de €/dosis.

25

- Se debe asegurar la bioseguridad, sobre todo en la utilización de vacunas vivas atenuadas, vectores potenciales de agentes patógenos contaminantes. Conviene recordar que los animales reproductores son vacunados y que una contaminación accidental en la parte superior de la pirámide de selección tendría unos efectos dramáticos sobre el conjunto de la cadena de producción.

30

De entre las muchas patologías de origen viral, la enfermedad de Marek (Marek Disease - MD) es una enfermedad infecciosa linfoproliferativa que afecta a las células T en el pollo. Las formas clínicas de la MD afectan principalmente a la gallina (*Gallus gallus*), pero otras especies de aves del orden de las Galliformes también pueden ser infectadas y presentar síntomas (codorniz o pavo). Esta enfermedad apareció poco a poco como un obstáculo importante para la producción avícola en todo el mundo durante los años 1960. La enfermedad de Marek, considerada como la segunda enfermedad infecciosa para las gallinas ponedoras, tiene un impacto global estimado de 1000 millones de \$/año, estando estas pérdidas relacionadas con la patología y con los costes de las vacunaciones (cifra de la FAO, 2002).

35

40

La enfermedad de Marek se debe a un virus del herpes de la subfamilia de los alfa-herpesvirinae, del género *Mardivirus*, llamado virus de la enfermedad de Marek (MDV) o Gallid herpesvirus de tipo 2 (GaHV-2). El género *Mardivirus* cuenta con otros cuatro virus aviares: Gallid herpesvirus de tipo 3 (GaHV-3), Meleagrid herpesvirus (MeHV - HVT por Herpes Virus of Turkey) que afecta más específicamente a los pavos, Colombid herpesvirus 1 (CoHV-1), que afecta en particular a las Columbiformes y el Anatid herpesvirus 1 (AHV-1), que afecta en particular a las anátides (patos, ocas).

45

El MDV se propaga rápidamente a través de las granjas por contacto directo de los animales sanos con pollos infectados, o por exposición en locales, camadas, polvo contaminado con residuos de faneros de los animales infectados. La entrada del virus tiene lugar a nivel de las vías respiratorias, en donde los linfocitos B pulmonares juegan un papel importante en la progresión de la enfermedad.

50

Unas formas extremadamente agudas de la enfermedad aparecieron en la década de 1990, asociadas a la aparición de virus muy patógenos.

55

Desde los años 1970, las vacunas han permitido controlar la enfermedad de Marek en las granjas avícolas. Sólo son eficientes las vacunas vivas y existen 2 tipos de vacunas, las obtenidas por la atenuación del GaHV-2 (homólogas), o las derivadas de cepas naturalmente no patógenas, MeHV-1 o GaHV-3 (heterólogas). Las preparaciones vacunales derivadas de MeHV-1 se administran *in ovo* a los embriones de 17-18 días y las vacunas homólogas se inyectan en los polluelos en la eclosión. La infecciosidad del virus GaHV-2 se asocia con las células infectadas vivas: no hay viriones libres detectables en los sobrenadantes y en los lisados celulares (Churchill, 1968). La propagación de la infección con GaHV-2 necesita por lo tanto *in vitro* el cocultivo de células infectadas con células intactas o, *in vivo*, la administración, por inyección a los animales, de las células infectadas vivas. Por lo tanto, las vacunas GaHV-2 actuales están constituidas por células infectadas en cultivo celular y congeladas.

60

65 **Estado de la técnica**

El estudio de las relaciones entre el virus y las células sólo se puede llevar a cabo con las denominadas células permisivas y, para el MDV, la replicación se restringe a las células aviares. Se dice que una célula es permisiva

cuando permite que el virus se multiplique y produzca nuevos viriones infecciosos. El genotipo y el estado de diferenciación de una célula son los dos factores principales determinantes de la permisividad de una célula a la infección por un virus.

5 La propagación de los Mardivirus en un cultivo celular está actualmente restringido a las células aviares de explantación primaria o secundaria. Se obtienen actualmente unos niveles de replicación satisfactorios en 4 tipos celulares diferentes: fibroblastos de embriones de pollo (CEF), fibroblastos de embriones de pato (DEF), (Solomon *et al.*, 1968), células de riñón de pollo (CKC) (Churchill, 1968) o células de piel de embriones de pollo (CESkC) (Dorance *et al.*, 2000).

10 El pequeño número de líneas celulares aviares permisivas que permiten una replicación eficaz de los virus aviares plantea un problema tanto para los científicos como para los industriales productores de vacunas.

15 Este problema se plantea con gran sensibilidad para los Mardivirus, para los que hasta la fecha no hay disponible una línea aviar no transformada que permita una replicación eficaz, es decir productora, de todos los Mardivirus. Por lo tanto, las vacunas todavía se producen exclusivamente en células aviares primarias obtenidas mediante la puesta en cultivo de células embrionarias o por disociación enzimática de órganos explantados de aves (Galliformes o Anseriformes). Esto supone unos costes importantes, circuitos de producción y controles complejos que permiten certificar la ausencia de agentes contaminantes para cada ciclo de producción. Hasta  
20 ahora, las pruebas de aislamiento de líneas celulares a partir de células explantadas de órganos o de embriones han resultado ser poco fructíferas.

25 En la actualidad, sólo una línea derivada de la línea DF-1 (JB-J1) parece poder cumplir con los criterios esenciales para una producción industrial de virus vacunas (Geerligts *et al.*, 2008) sin que se haya demostrado que esta línea pueda servir de sustrato para la replicación de los virus no "adaptados" al cultivo celular (virus "silvestres" recuperados en un animal infectado). Para estos virus "silvestres", los únicos resultados reportados se refieren a la utilización de una línea de células transformadas de codorniz (QM7) que sobreexpresan un gen de glicoproteína viral, gE (Schumacher *et al.*, 2002). Estas células llamadas SOgE soportan el crecimiento de cepas virales MDV-1 a un nivel comparable al observado en cultivos primarios de células embrionarias. No  
30 obstante, esta última línea celular se deriva de una línea de células transformadas, es decir, capaces de multiplicarse indefinidamente con, en el animal, un poder tumorigeno potencial relacionado con el proceso de inmortalización; por tanto, es peligroso utilizar tales células para la preparación de preparaciones vacunales destinadas a ser inyectadas en pollos, ya que su proliferación no está controlada. Además, las células SOgE son unos Organismos Genéticamente Modificados cuya utilización está estrictamente legislada, y que probablemente  
35 no serán permitidos para su utilización en preparaciones vacunales.

Cabe señalar que las células DF1 (y por lo tanto las JB-J1 que se derivan de las mismas) se obtienen mediante un establecimiento espontáneo de fibroblastos embrionarios primarios obtenidos a partir de un embrión incubado durante 10 días, como se describe en el documento WO 98/006824. Por tanto, estas células se derivan de  
40 células somáticas que ya participan en una vía de diferenciación.

45 De la misma manera, las células CHCC-OU2, descritas en la solicitud de patente EP 775 746, se derivan de células de embriones incubados durante varios días. Estas células se establecen en línea por la acción inmortalizante de un tratamiento químico de las células primarias con la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), como se describe en la publicación de Ogura y Fujiwara (1987). La acción de un tratamiento de este tipo sobre las células aviares es conocido y da como resultado la obtención de una línea inmortalizada, pero que tiene propiedades oncogénicas. Así, por ejemplo, las células fibroblásticas de codorniz QT6 que también han sido obtenidas por tratamiento químico tienen propiedades tumorígenas (Moscovici *et al.*, 1977). Además, no está establecida la permisividad de las células CHCC-OU2 para replicar los mardivirus. Tal como están las cosas, las células CHCC-OU2 no forman un sistema catalogado como permisivo para los Mardivirus. Por otra parte, la línea derivada de CHCC-OU2 descrita en la solicitud de patente EP 775 743 es una línea crónicamente infectada por un virus MDV, y no una línea celular permisiva para la replicación de los Mardivirus.

55 De la misma manera, Lee *et al.* (2013) describen unas células obtenidas por inmortalización de células hepáticas de un embrión ya incubado, como la obtención de la línea LMH, derivada a su vez de células hepáticas embrionarias establecidas a consecuencia de un tratamiento químico (Kawaguchi *et al.*, 1987). Estas células, como en el caso de las células QT6, son muy tumorígenas. No se describen como fibroblastos, y son poco o nada permisivas a los Mardivirus (títulos infecciosos = 10 unidades formadoras de placa (ufp) contra 500000 para ESCDL-1): por lo tanto, no se ha establecido que las células sean capaces de replicar realmente el virus, pudiendo las 10 ufp residuales ser debidas a la persistencia de células DF-1 (inóculo viral constituido por células infectadas) en el cocultivo con las células CEL.im.

60 El documento SCHAEFER-KLEIN J ET AL: "The EV-O-Derived Cell Line DF-1 Supports the Efficient Replication of Avian Leukosis-Sarcoma Viruses and Vectors", VIROLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 248, nº 2, 1 septiembre 1998 (1998-09-01), páginas 305-311 describe que la línea de células DF-1, una línea continua no transformada de células fibroblásticas de un embrión de pollo EV-O es susceptible de infección por el virus aviar ASLV.

El documento WO 2007110341 describe un procedimiento de preparación de células aviares diferenciadas a partir de células madre aviares cultivadas en un medio de cultivo apropiado, caracterizado por que comprende una etapa de inducción de la diferenciación de las células madre por inhibición de la expresión o de la actividad de un gen expresado en dichas células madre, seleccionado de entre los genes 1P06, Nanog y Eomes (reivindicación 1). Según un modo de realización preferido, dicha inhibición se realiza por introducción de un ARN de interferencia (ARNsi) (reivindicación 3).

El documento KITAGAWA R ET AL: "Hexamethylene bisacetamide can convert nonpermissive human cells to a permissive state for expressing the major immediate-early genes of human cytomegalovirus by up-regulating NF-kappaB activity", VIROLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 383, n° 2, 20 enero 2009 (2009-01-20), páginas 195-206 describe la inducción por tratamiento de células con la HMBA de un estado permisivo para la infección por el citomegalovirus humano.

Finalmente, las células EB66, descritas en la solicitud de patente EP 2 572 728 y en Brown SW et al, PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, vol. 64, (2010-09-01), páginas 419-425 son de origen embrionario, al igual que las células cES origen de las células ESCDL1 de la presente invención. Sin embargo, conservan las características de las células ES, en particular una expresión de los marcadores cPOUV/OCT4 y NANOG. Además, estas células EB66 no son permisivas para los Mardivirus.

### Exposición de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento que permite la obtención de una línea celular no transformada, permisiva para la replicación de los virus aviares, que se puede utilizar en preparaciones vacunales.

La invención se refiere a un procedimiento de inducción de la diferenciación de las células madre aviares, que desemboca en la obtención de una línea no transformada, derivada de las células madre embrionarias (ES), que ya no expresa los marcadores característicos de las células madre (cPOUV y NANOG), estable fenotípicamente durante por lo menos 60 pasadas después del establecimiento, y que permite la replicación de virus aviares.

El procedimiento comprende por lo menos las siguientes etapas:

- a) puesta en cultivo de células madre embrionarias aviares en presencia de un estroma durante por lo menos 3 días;
- b) cultivo de las células procedentes de una de las etapas a), o c), o d) en un medio con baja concentración de suero durante por lo menos 2 días;
- c) cultivo de las células procedentes de una de las etapas a), o b), o d) en un medio con baja concentración de suero que comprende entre 1 y 10 mM de hexamétilen bisacetamida (HMBA) durante por lo menos 2 días;
- d) cultivo de las células procedentes de una de las etapas a), o b), o c) en un medio con baja concentración de suero durante por lo menos 10 días;
- e) cultivo o congelación de una línea celular aviar resultante de las etapas a), b), c) y d), que permite la replicación de los virus aviares.

La invención se refiere asimismo a la línea celular tal como la obtenida mediante el procedimiento anterior, caracterizada por que expresa los marcadores siguientes: CD44+, integrina beta1, colágeno 1 y OLFM3.

La presente invención se refiere también a la utilización de la línea celular descrita anteriormente como sustrato para la producción *in vitro* de virus aviares o para titular virus aviares.

Otro objeto de la presente invención se refiere por otro lado a un procedimiento de preparación *in vitro* de una preparación vacunal, que comprende la puesta en cultivo de la línea tal como la descrita anteriormente y su infección por lo menos por un virus aviar, así como a la preparación vacunal propiamente dicha que comprende una línea celular tal como la descrita anteriormente, infectada por lo menos por un virus aviar.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para obtener una línea celular aviar no transformada que permite la replicación de los virus aviares *in vitro*, que comprende por lo menos las siguientes etapas:

- A) puesta en cultivo de células madre embrionarias aviares en presencia de un estroma durante por lo menos 3 días;

B) cultivo en un medio con baja concentración de suero durante por lo menos 2 días;

5 C) cultivo en un medio con baja concentración de suero que comprende entre 1 y 10 mM de hexametilén bisacetamida (HMBA) durante por lo menos 2 días;

D) cultivo en un medio con baja concentración de suero durante por lo menos 10 días;

10 E) cultivo o congelación de una línea celular aviar que permite la replicación de virus aviares.

El procedimiento según la invención tiene como "producto de origen", o células de partida o células iniciales, unas células madre embrionarias aviares (células ES), que expresan específicamente los marcadores cPOUV y NANOG como se describe en Laval *et al.* 2007.

15 La diferenciación de las células ES aviares por exposición a unas concentraciones reducidas de suero se traduce por un cambio morfológico (aumento de tamaño de las células y aumento de la relación citoplasma/núcleo), y la adquisición de una baja permisividad para la replicación de los virus "adaptados" al cultivo en las células.

20 El establecimiento de una línea permisiva a partir de células ES aviares se realizó de acuerdo con una lógica de inducción basada en la exposición a por lo menos una matriz extracelular compleja, y a la acción de citodiferenciación de la HMBA.

25 La presente invención permite obtener unas células permisivas para la replicación de los virus aviares que se establecen en línea, sin tener que recurrir a la transformación por un oncogén o un procedimiento de immortalización con la ayuda de un agente externo tal como un agente químico, contrariamente a las células de la técnica anterior, en particular las células CHCC-OU2. Las células de la invención son establecidas por diferenciación, en particular con la ayuda de un tratamiento químico de citodiferenciación (HMBA), y no por transformación o immortalización. El establecimiento de estas células permisivas es, por tanto, no espontáneo, contrariamente a ciertas células de la técnica anterior como las células DF1, ya que se derivan de las células ya establecidas (células ES) y no de una célula primaria somática.

#### Definiciones

35 Generalmente, en el marco de la presente invención, la expresión "replicación de los virus aviares" debe entenderse como una replicación eficaz y productiva de virus. De esta manera, por "línea o células permisivas para la replicación de los virus aviares", se entiende una línea celular o unas células capaces de cumplir el conjunto de las etapas del ciclo viral que desembocan en la producción de una progenie viral constituida por viriones infecciosos, y en particular por Mardivirus y Birnavirus (en el caso de los Mardivirus, los viriones infecciosos están asociados a las células dentro de un inóculo). Como se ha indicado anteriormente, una célula permisiva permite la entrada y la replicación productiva del virus. La permisividad para la replicación de los virus aviares es variable de un virus a otro, lo cual el experto en la materia sabrá apreciar caso por caso, en función de los virus considerados. El experto en la materia, sabrá determinar así el factor multiplicativo buscado para cada partícula inicial de acuerdo con el tipo de virus probado.

45 El término "puesta en cultivo en un medio apropiado" es fácilmente comprensible por el experto en la materia especializado en cultivo celular. Designa el hecho de hacer crecer células *in vitro*, en un medio nutritivo apropiado, muy a menudo líquido, en unas condiciones optimizadas para el crecimiento de las células, en particular en términos de temperatura y de concentración controlada de CO<sub>2</sub>. El "medio apropiado" designa un medio de cultivo convencional, adaptado a las células aviares, que comprende suero.

50 El término "suero" se refiere al líquido de la sangre desprovisto de sus células y de las proteínas de la coagulación. Es el líquido sobrenadante obtenido después de la centrifugación de la sangre, sin ningún inhibidor de la coagulación. Este líquido contiene un gran número de nutrientes (aminoácidos, vitaminas, etc.), proteínas solubles (anticuerpos, albúmina, citocinas, factores de crecimiento, etc.), así como diversos iones (sodio, cloruro, etc.). En la presente solicitud, el término "suero" se refiere tanto al suero de bovino fetal, utilizado convencionalmente en cultivo celular, como al suero de pollo. Se puede usar una combinación de ambos para asociar las ventajas de cada suero. El suero se añade al medio de cultivo según un porcentaje del volumen total, es decir unos 100 ml de suero en un litro de medio total se expresa como una concentración de "10% de suero".

60 La expresión "bajo contenido o concentración de suero" designa un porcentaje de suero inferior a 5%, en particular 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, o 4% de suero.

65 Según la invención, el término "estroma" designa una matriz extracelular compleja derivada de células. Por ejemplo, el estroma según la invención se puede preparar a partir de células primarias de piel de pollo según el procedimiento descrito por Coraux (Coraux *et al.*, 2003); se debe observar que en esta publicación, este estroma se había utilizado para la diferenciación de las células madre embrionarias de ratón en tejido epidérmico. El estroma también se puede derivar de células permisivas para los virus aviares (*Stromal cell-Derived Inducing*

*Activity* - SDIA - (Kawasaki et al., 2000)) o también de cualquier tipo de células no permisivas para los virus. Entre estas últimas está comprendida una lista no exhaustiva de fibroblastos primarios embrionarios de ratón (MEF), utilizados habitualmente como tapiz nutritivo después de inactivación por la acción de la mitomicina o irradiación, fibroblastos de ratón establecidos en líneas como células STO (ATCC CRL 1503), que permiten el mantenimiento de las células ES, células 3T3-J2 (Panacchia et al. 2010), las células de estroma de médula, como las células PA6 (también llamadas MC3T3 G2) que permiten la diferenciación neurectodérmica (Correia et al., 2008), las células de estroma de médula como las células OP9 (ATCC CRL2749) (Nakano et al., 1994) que permiten la inducción de la diferenciación linfopoyética, o queratinocitos humanos o animales o cualquier tipo celular que tenga un interés para el experto en la materia. En el marco de la invención, el experto en la materia sabrá adaptar el tipo de estroma al tipo de diferenciación.

El factor de diferenciación hexametilén bisacetamida (HMBA - de fórmula química  $\text{CH}_3\text{CONH}(\text{CH}_2)_6\text{NHCOCH}_3$ ) es conocido por su acción de citodiferenciación con respecto a las células murinas de línea eritroleucémica en las que la diferenciación está asociada a una pérdida de la capacidad para proliferar (Marks & Rifkind, 1989). En el contexto de las infecciones por los herpesvirus, la inducción por la HMBA confiere a las células o bien una permisividad incrementada que permite la replicación de ciertos virus defectuosos (Preston & McFarlane, 1998), o bien una expresión incrementada de los factores de transcripción PBX/HOX que favorecen la replicación viral (Storlie et al., 2006). La HMBA se utiliza habitualmente, a unas dosis de 1 a 10 mM, como agente de inducción de diferenciación para las células primarias de piel de embrión de pollo que sirve de sustrato para la replicación de los Mardivirus (Denesvre et al., 2007).

El término "pasada" se refiere al cultivo de células que han alcanzado una tasa de ocupación máxima de su soporte. Las células se separan de su soporte por la acción rápida de una enzima o de un cóctel de enzimas proteásicas (tripsina, pronasa, dispasa, colagenasa) que disocian las células entre sí y que favorecen su desprendimiento de la matriz extracelular (acción de "tripsinización"), y se diluyen en un medio de cultivo antes de ser inoculadas en un nuevo soporte para una nueva puesta en cultivo de unos días. Convencionalmente, las células desprendidas de su soporte se cuentan antes de ser inoculadas en una cierta proporción de células/cm<sup>2</sup> en placas de cultivo pretratadas durante por lo menos 20 minutos con una solución de gelatina bovina al 0,1% en tampón fosfato (PBS), con el fin de aportar a las células transferidas una matriz extracelular que favorece su adherencia sobre el soporte plástico.

Las diferentes etapas a), b), c) y d) se practican durante el tiempo necesario. En particular, el experto en la materia hará un seguimiento de la diferenciación de las células visualizando, con la ayuda de un microscopio, su crecimiento y su viabilidad, y será capaz de decidir si la etapa debe continuar más allá del tiempo mínimo indicado.

La etapa a) de cultivo en presencia de un estroma se llevará a cabo durante por lo menos 2 días, preferentemente durante por lo menos 3 días, en particular 3 días, más preferentemente durante 3 a 5 días.

La etapa b) de cultivo en un medio con baja concentración de suero se llevará a cabo durante por lo menos 2 días, preferentemente durante 3 días.

La etapa c) de cultivo en un medio que comprende HMBA se llevará a cabo durante por lo menos 2 días, preferentemente durante 3 días.

La etapa d) de cultivo en un medio con baja concentración de suero se llevará a cabo durante por lo menos 10 días, preferentemente durante 15 días.

Preferentemente, después de las diversas etapas b), c) y d), el procedimiento comprende además unas etapas de cultivo de las células en un medio de crecimiento apropiado, en particular en un medio que comprende más del 5% de suero, y preferentemente aproximadamente 10% de suero.

La última etapa e) corresponde a la obtención de la línea celular permisiva para la replicación de los virus que, dependiendo de los casos, se podrá utilizar posteriormente para la replicación de virus o podrá ser congelada según la técnica bien conocida por el experto en la materia.

El procedimiento puede ser detallado como se indica a continuación:

a) puesta en cultivo de células madre embrionarias aviares en presencia de un estroma durante 4 días;

b) cultivo de las células en un medio con baja concentración de suero durante 3 días;

c) cultivo de las células en un medio que contiene 10% de suero durante 10 días;

d) cultivo de las células en un medio con baja concentración de suero que comprende entre 1 y 10 mM de HMBA (hexametilén bisacetamida), durante 3 días;

- e) cultivo de las células en un medio con baja concentración de suero durante 15 días;
- f) cultivo o congelación de una línea celular aviar que permite la replicación de virus aviares.

5 De manera aún más detallada, el procedimiento puede comprender las etapas siguientes:

- a) puesta en cultivo de células madre embrionarias aviares en presencia de estroma durante 4 días;
- b) cultivo de las células en un medio con baja concentración de suero durante 3 días;
- 10 c) cultivo de las células en un medio que contiene 10% de suero durante 10 días, y paso por tripsinización;
- d) cultivo de las células en un medio con baja concentración de suero que comprende entre 1 y 10 mM de HMBA (hexametilen bisacetamida), durante 3 días;
- 15 e) paso de las células por tripsinización en un medio que contiene 10% de suero durante 3 días
- f) cultivo de las células en un medio con baja concentración de suero durante 15 días;
- 20 g) paso de las células por tripsinización en un medio que contiene 10% de suero durante 12 días;
- h) cultivo o congelación de una línea celular aviar que tiene un fenotipo estable durante por lo menos 60 pasadas en un medio de cultivo apropiado y que permite la replicación de los virus aviares.

25 Todas las etapas de a) a d), a) a f) y a) a h) del procedimiento de la invención tal como se han descrito anteriormente se pueden llevar a cabo en cualquier orden, ventajosamente se llevan a cabo en el orden de a) a d), de a) a f) y de a) a h). Por ejemplo, cuando las etapas a) a d) se llevan a cabo en este orden, el procedimiento de la invención comprende por lo menos las siguientes etapas:

- 30 A) puesta en cultivo de células madre embrionarias aviares en presencia de un estroma durante por lo menos 3 días;
- B) cultivo de las células procedentes de la etapa a) en un medio con baja concentración de suero durante por lo menos 2 días;
- 35 C) cultivo de las células procedentes de la etapa b) en un medio con baja concentración de suero que comprende entre 1 y 10 mM de hexametilen bisacetamida (HMBA) durante por lo menos 2 días;
- 40 D) cultivo de las células procedentes de la etapa c) en un medio con baja concentración de suero durante por lo menos 10 días;
- E) cultivo de las células procedentes de la etapa d), o congelación de una línea celular aviar que permite la replicación de virus aviares.

45 El producto resultante del procedimiento consiste en unas células permisivas para la replicación de los virus aviares, que pueden ser mantenidas con el mismo fenotipo durante por lo menos 60 pasadas en un medio de cultivo apropiado, y que ya no expresan los marcadores cPOUV y NANOG característicos de las células ES.

50 Estas células se bautizaron "ESCDL-1" por "Embryonic Stem Cell Derived Line 1". Las ESCDL-1 son unas células adherentes, un aspecto fibroblástico, es decir, más extendidas y menos estiradas que un fibroblasto primario. Se diferencian de la línea de células ES por su morfología, sus características de crecimiento, y la extinción de la expresión de marcadores de células ES.

55 Esta última característica también permite distinguir las células de la técnica anterior, como las células EB 66 (véase EP 2 572 728) o las células DF1, LMH, CEF y cES (BP25) (véase el ejemplo 2 de la presente solicitud), en las que se mantiene la expresión de los marcadores de las células ES. Por lo tanto, las células ESCDL-1 de la invención no expresan por lo menos uno de los siguientes marcadores: cPOUV/OCT4, NANOG, SSEA1, EMA1, IXF1, KRT8 y KRT19. Más preferentemente, no expresan por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, por lo menos cinco, o por lo menos seis de estos marcadores. Aún más preferentemente, no expresan ninguno de estos marcadores.

60 Por otra parte, las células ESCDL-1 de la invención expresan fuertemente el gen OLFM3 y los genes WISP1, THBS2 y EDN2 a unos niveles comparables a los observados en unos fibroblastos primarios.

65 Las células de la invención tienen una actividad telomerasa baja en comparación a la de las células ES. Las células ESCDL1 son unas células no transformadas y establecidas en una línea que proliferan, pero que no son tumorigenas, contrariamente a las líneas establecidas químicamente o por la acción de un inmortalizante

exógeno. La capacidad de proliferación de las células ESCDL-1 (20% de las células en fase S) es superior la de células primarias de piel embrionaria de pollo (CEPP) (3% de células en fase S). Además, es interesante subrayar que las células ESCDL-1 son sensibles a los inductores de apoptosis y tienen una fuerte propensión a inducir procesos autofágicos en un medio empobrecido en factores de crecimiento o en presencia de un inductor de autofagia.

El procedimiento según la invención permite obtener una línea celular permisiva para la replicación de muchos virus aviares (en particular, herpesvirus, Poxvirus, Coronavirus, Birnavirus, Reo y Rotavirus) y en particular para los Mardivirus y el Birnavirus, agente de bursitis infecciosa (IBDV).

Según un aspecto preferido de la invención, las células madre embrionarias aviares de partida o iniciales son unas células procedentes del pollo. Preferentemente, las células ES proceden de un pollo de genotipo Cou-nu heterocigoto (Na/na).

Más preferentemente, las células madre embrionarias aviares iniciales son unas células aisladas a partir de blastodermos en los estados X a XIV (según Eyal Giladi y Kovak, 1976). Contrariamente a ciertas células de la técnica anterior, la línea celular según la invención es de origen embrionario no incubada puesto que se deriva de células madre embrionarias, obtenidas a su vez a partir de la puesta en cultivo de estas células de blastodermos no incubados.

Estas células madre embrionarias aviares iniciales expresan numerosos genes marcadores, tales como los presentados en la solicitud de patente WO 2007/110343, y en particular los genes marcadores cPOUV y NANOG.

Según un aspecto preferido de la invención, la línea celular aviar obtenida tiene un fenotipo estable durante por lo menos 60 pasadas sucesivas, preferentemente por lo menos 70 pasadas, más preferentemente por lo menos 80 pasadas, a partir de su establecimiento.

Preferentemente, las características fenotípicas de las células aviares según la invención son más particularmente las siguientes:

- Morfología de tipo fibroblástica/mesenquimatosa;
- Expresión de CD44, integrina beta1 y colágeno 1;
- Falta de expresión de marcadores de las células ES, en particular cPOUV y NANOG, KRT19 y KRT8, pero fuerte expresión del gen OLFM3 y la expresión mantenida de los genes WISP1, THBS2 y EDN2 a unos niveles comparables a los observados en fibroblastos primarios; y
- Permisividad para la replicación de los Mardivirus y de los Birnavirus aviares.

Por célula fibroblástica mesenquimatosa se entiende una célula que tiene una morfología similar a la de las células poco diferenciadas de los tejidos conjuntivos, en particular con largas prolongaciones y un núcleo ovoide en el centro de la célula.

Según otro aspecto de la invención, la línea celular aviar obtenida puede ser modificada genéticamente para expresar proteínas de interés. Las proteínas de interés pueden ser proteínas "reporteras" (proteínas fluorescentes, enzimas tales como las diferentes formas de luciferasas o fosfatasa, etc.), enzimas de modificación del genoma (recombinasas), proteínas virales autólogas o heterólogas que pueden intervenir como complemento para unos virus de los cuales ciertos genes han sido delecionados, o también proteínas celulares cuya sobreexpresión podría tener un impacto sobre la replicación viral.

Como se muestra en los ejemplos, incluso modificada genéticamente como se ha descrito anteriormente, la línea celular aviar según la invención conserva su permisividad para los virus aviares.

La presente invención se refiere asimismo a una línea celular que se puede obtener mediante el procedimiento descrito anteriormente, es decir, una línea celular no transformada que permite la replicación de los virus aviares *in vitro*, en particular al mismo tiempo de los Mardivirus y de los Birnavirus.

En particular, esta línea celular expresa los siguientes marcadores: CD44<sup>+</sup>, integrina beta1 y colágeno 1. Por el contrario ya no expresa los antígenos reconocidos por los anticuerpos IXF1, MC-480 (SSEA1) y EMA-1, mientras estos últimos son expresados por las células madre embrionarias iniciales. Ya no expresan los genes cPOUV/OCT4, NANOG, KRT19 y KRT8, pero expresan fuertemente el gen OLFM3 y los genes WISP1, THBS2 y EDN2 a unos niveles comparables con los observados en fibroblastos primarios (tomados igual a 1 en la figura). El nivel de estos genes en las células fibroblásticas DF1 es de 10 a 100 veces menor (figura 5). De la misma manera, las células hepáticas LMH no tienen absolutamente el mismo perfil de expresión de estos marcadores. La presente invención se refiere también a una utilización de la línea celular descrita anteriormente como

sustrato para la producción *in vitro* de virus aviare.

La presente invención se refiere asimismo a una utilización de la línea celular tal como se ha descrito anteriormente para titular los virus aviare, y determinar así la importancia de la infección viral.

Finalmente, la presente invención se refiere asimismo a un procedimiento de preparación *in vitro* de una preparación vacunal, que comprende la puesta en cultivo de la línea tal como se ha descrito anteriormente y su infección por lo menos por un virus aviar. En otras palabras, la invención se refiere a un procedimiento de preparación *in vitro* de una preparación vacunal, que comprende por lo menos las siguientes etapas:

- A) puesta en cultivo de células madre embrionarias aviare en presencia de un estroma durante por lo menos 3 días;
- B) cultivo en un medio con baja concentración de suero durante por lo menos 2 días;
- C) cultivo en un medio con baja concentración de suero que comprende entre 1 y 10 mM de hexametilén bisacetamida (HMBA) durante por lo menos 2 días;
- D) cultivo en un medio con baja concentración de suero durante por lo menos 10 días;
- E) cultivo o congelación una línea celular aviar que permite la replicación de virus aviare.
- F) infección de la línea celular obtenida por lo menos por un virus aviar.

La presente solicitud se refiere también a una preparación vacunal que comprende una línea celular tal como se ha descrito anteriormente, infectada por lo menos por un virus aviar.

En el marco de las diferentes utilizaciones especificadas anteriormente, los virus aviare se seleccionan en particular de entre los Mardivirus y los Birnavirus.

### Descripción de las figuras

Figura 1: Protocolo de establecimiento de la línea ESCDL-1: El período inicial de inducción de las células BP25-36b está representada entre los días 0 y 45 por la barra central, que muestra la alternancia de los medios utilizados para el cultivo de las células. El recuento de pasadas se indica arriba, pasadas 1 al 6 (P1 a P6). P1† corresponde de hecho a una tripsinización corta destinada a eliminar las células muertas, seguida de una incubación en un medio SVF al 10%. El recuento de los días con respecto al comienzo del cultivo aparece debajo de la barra central (D0 a 45). Los medios indicados son el medio E de William (WE) o el DMEM/F12. Las concentraciones 1-1,5% se refieren a unas concentraciones de SVF (1%) y suero de pollo (1,5%). La abreviatura GF corresponde a "growth factors", tal como se utilizan en el medio de crecimiento de las células BP25 y descritos en materiales y procedimientos.

Figura 2: Células ESCDL-1: células en la pasada 52, en cultivo con densidad baja (A) o media (B) 24 horas después de la división. La barra de escala representa 50 µm (microscopia en contraste de fase).

Figura 3: Curva de crecimiento de las células ESCDL-1 entre las pasadas 25 y 30.

Figura 4: Expresión génica de los marcadores de células madre en RT-PCR: Oct4 (cPOUV) y NANOG.

Figura 5 a): Análisis de la expresión de genes expresados diferencialmente entre las células ESCDL1, DF1 y LMH. El nivel de expresión de los genes se midió por PCR en tiempo real, siendo el gen RSP17 tomado como referencia como se ha descrito anteriormente (Lavial *et al.*, 2007). El nivel relativo de expresión se considera igual a 1 en el tipo celular de los CEF, fibroblastos embrionarios primarios de pollo. b) Análisis de la expresión de genes expresados más específicamente en las células madre embrionarias (cES). El nivel de expresión en estas células se considera igual a 1. Los niveles en las células ESCDL1, DF1 y LMH son muy inferiores (entre 1000 y 10000 veces menos expresado), o incluso indetectable en ciertos casos (NANOG, por ejemplo).

Figura 6: Replicación de los Mardivirus: Comparación de la producción viral (B20UL17mRFP) en las células primarias (1 y 2) con la obtenida en las ESCDL-1 P41 (3 y 4). Las titulaciones se efectuaron en células primarias (A), ESCDL-1 en las pasadas 43 (B) y 98 (C). H+: HMBA 5mM; AA: Ácido ascórbico 0,3 mM.

Figura 7: Diseminación viral - Análisis del tamaño de las zonas inducidas por la multiplicación del virus en células primarias (CESkC) y en células de la línea ESCDL-1.

## Ejemplos

### Materiales y Procedimientos

#### 5 1. Factores de crecimiento, productos químicos y anticuerpos

Los factores de crecimiento (PeproTech - Francia) para el crecimiento de las células madre embrionarias aviares se usaron en las siguientes concentraciones:

- 10      ▪ IGF-1      (PeproTech-100-11) a 5 ng/ml
- IL6        (PeproTech-200-06) a 2 ng/ml
- sIL6-Ra   (PeproTech-200-06R) a 2 ng/ml
- SCF       (PeproTech-300-07) a 1 ng/ml

15      La HMBA [*N,N'*-hexametileno bis(acetamida) - ref. 224235], el ácido retinoico (ref. R2625), el DMSO (sulfóxido de dimetilo - ref. D2650), el valproato (ácido valproico, sal de sodio - ref. P4543) fueron comprados a Sigma - Aldrich (Sigma Aldrich - Francia) y se usaron a las concentraciones indicadas en el texto.

#### 20 2. Células

a. Células madre BP25: las células se mantuvieron en las condiciones descritas (Pain *et al.*, 1996), sobre una capa nutricional (feeder-layer) de células STO irradiadas, en un medio DMEM/F12 (1:1) (Gibco-Invitrogen - Francia) adicionado con 10% de suero fetal de bovino (SVF) (PAN - D. Dutscher - Francia), con piruvato de sodio (1 mM - Lonza - Francia), con glutamina (2mM - Lonza - Francia) y con aminoácidos no esenciales (NEAA 100X - Lonza - Francia) y que contienen los factores de crecimiento a las concentraciones indicadas en el párrafo anterior (medio ES).

b. Células ESCDL-1: Las células ESCDL-1 se obtuvieron por diferenciación de las células BP25 (véase más abajo). Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera que contenía 5% de CO<sub>2</sub>, en un medio DMEM/F12 (1:1) (Invitrogen - Francia) adicionado con 10% de SVF (PAN - D. Dutscher - Francia), con piruvato de sodio (1 mM - Lonza - Francia), con glutamina (2 mM - Lonza - Francia) y con aminoácidos no esenciales (NEAA 100X - Lonza - Francia). Las células se sometieron a tripsinación dos veces por semana (tripsina 10X - T4549 - Sigma Aldrich - Francia) y se dividieron según una proporción de 1 por 3.

c. Células primarias de piel embrionaria de pollo (CESKc): las células primarias se obtuvieron según el protocolo descrito (Dorange *et al.*, 2000).

d. Células 3867K y NWB: las líneas transformadas por el virus RB-1B-UL47EGFP (Jarosinski *et al.*, 2012), obtenidas en el laboratorio de V. Nair, se cultivaron en un medio RPMI 1640 (Lonza - Francia) que contenía 10% de SVF, 10% de caldo de triptosa fosfato (TPB) (ref. T8782 - Sigma Aldrich - Francia) y 4,5 g/l de glucosa. Las 2 líneas linfocitarias transformadas 3867K y NWB proceden de tumores renales extraídos de pollos infectados por el virus RB-1B-UL47EGFP (las líneas fueron proporcionadas por Lorraine Smith - The Pirbright Institute - Compton, Berkshire, Reino Unido).

#### 3. Virus

##### a. GaHV-2 (MDV)

i. Bac20 y virus derivados: Los virus Bac20 (Schumacher *et al.*, 2000), Bac20eGFPVP22 (Denesvre *et al.*, 2007) y Bac20UL17-mRFP (Chbab *et al.*, 2009) se obtuvieron por transfección de bácmidos que contienen el genoma viral parental (Bac20) o mutado.

ii. Virus RB-1B y virus derivados: el virus RB-1B se obtuvo en unas condiciones de transfección de bácmido similares a las descritas para Bac20, a partir del bácmido descrito por L. Petherbridge (Petherbridge *et al.*, 2004). El virus RB-1B-UL17mRFP se construyó según la misma lógica que el Bac20UL17-mRFP en el contexto del bácmido RB-1B descrito por Jarosinski (Jarosinski *et al.*, 2007). El virus RB-1B-UL47EGFP (Jarosinski *et al.*, 2012) se obtuvo poniendo en contacto las células ensayadas con las células 3867K o NWB.

b. MeHV1: la cepa vacunal FC-126 se pasó a un cultivo a partir de una preparación vacunal liofilizada (Lyomarex® - Merial - Francia). Todos los inóculos de Mardivirus (GaHV-2 y MeHV1) están constituidos por células infectadas, congeladas y conservadas en nitrógeno líquido.

c. GaHV-1 (ILTV): el virus utilizado corresponde a la cepa vacunal Nobilis® (Intervet - Francia). El virus se produjo en células LMH a partir de la preparación vacunal liofilizada. Los inóculos virales se

conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  después de centrifugación a 200xg de los sobrenadantes que proceden de las células infectadas (Fuchs & Mettenleiter, 1999).

- d. IBDV: el Birnavirus de la bursitis infecciosa del pollo, cepa vacunal CT, fue proporcionado por B. Delmas (Lejal *et al.*, 2000) en forma de sobrenadante de cultivo infectado.

#### 4. Diferenciación de las células madre

a. Exposición a los agentes de cito-diferenciación: las células BP25 en fase exponencial se tripsinaron, se contaron y se inocularon a  $1 \cdot 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en placas de cultivo pretratadas mediante una solución de gelatina bovina (gelatina bovina al 0,1% de PBS - ref. G9391 Sigma - Francia). Después de 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en medio E de William, que contenía 10% de suero fetal bovino, las células se incubaron durante 24 a 48 horas en el mismo medio que contiene 3% de suero de pollo (SP) (Gibco-InvitroGen - Francia) y 2% de suero fetal bovino (SVF). Los tapices confluyentes se expusieron durante 24 horas a las diferentes moléculas de cito-diferenciación en un medio E de William que contenía 1% de SVF y 1,5% de SP (WE 1-1,5%) y después se infectaron (véase más abajo).

b. ESCDL-1: las células BP25 en la pasada 36 se inocularon a  $1,5 \cdot 10^6$  células en una placa de 75 cm<sup>2</sup> que contenía una matriz extracelular preparada a partir de células primarias (CESkC) según un procedimiento adaptado de la publicación de C. Coraux (Coraux *et al.*, 2003). En primer lugar las células se cultivaron en un medio WE 10% SF durante 4 días (figura 1) y después se incubaron en un medio WE 1% SVF-1,5% SP durante 3 días, con un cambio de medio. Después de tripsinación, las células se volvieron a cultivar en placa de 75 cm<sup>2</sup> en WE que contenía 10% SVF durante 10 días, se sometieron a tripsinación y se expusieron a inducción por HMBA (5 mM) en WE 1% SVF-1,5% SP durante 72 horas (ESCDL-1 pasada 3). Las células se sometieron a tripsinación, se inocularon sobre soporte de cultivo con gelatina y se cultivaron en WE 10% SVF durante 1 pasada (P4). A continuación, las células se incubaron durante 15 días en WE 1% SVF-1,5% SP, se tripsinaron y se cultivaron en un medio DMEM-F12 que contenía 10% de SF (P5 a P7). A partir de la pasada 7, las células se tripsinaron dos veces por semana, se dividieron según una proporción de 1 por 3 y se cultivaron hasta la pasada 18 en el mismo medio. Las células se conservaron en nitrógeno líquido a partir de esta pasada (P18).

5. Transfección: Las células ESCDL-1 se transfectaron usando la tecnología Amaxa™ (Amaxa Nucleofector - Lonza - Francia), con el kit Basic Fibroblast (ref. VPI-1002) y unas cantidades de ADN plasmídico o bacmídico que varían de 4 a 8 µg para  $4 \cdot 10^6$  células. Después de la transfección las células se distribuyeron en 3 pocillos de una placa de cultivo de 6 pocillos, previamente gelatinizados, y se cultivaron durante 16 horas en un medio DMEM/F12 que contenía 10% de SVF. Las células se colcoaron en un medio adecuado al experimento (véase más abajo). Para la selección de líneas estables que expresan transgenes bajo un promotor pCMV en pCADN3, las células se colocaron en un medio de selección, DMEM/F12 10% de SVF que contenía 0,5 mg/ml de G418 (Ref - Sigma Aldrich), después de la primera tripsinación, 24 a 48 horas después de la transfección. En ausencia de gen de selección en el plásmido que codifica para el transgen, este último fue cotransfectado con un plásmido que aporta un gen de resistencia a la higromicina (pTK-HYG2). En este caso, las células se colocaron en un medio selectivo (DMEM/F12 10% SVF con 80 µg/ml de higromicina) desde las 24 horas después de la transfección.

#### 6. Infecciones virales

##### a. Preparación de los inóculos

i. Transfección de bácmidos: en las células ESCDL-1, los bácmidos que contienen los genomas virales se transfectaron por medio de la tecnología Amaxa. En las CESC BP25 inducidas, los bácmidos se transfectaron por medio del reactivo FuGENE (Roche) respetando las instrucciones del fabricante. Después de la transfección, las células ESCDL-1 se incubaron en medio DMEM/F12 10% SVF durante 16 horas y después en medio DMEM/F12 que contenía 1% de SVF, 1,5% de SP y 0,3 mM de ácido ascórbico. Las células BP25 inducidas se colocaron de nuevo en WE 1-1,5% con los inductores a las concentraciones descritas.

ii. Utilización de células infectadas clasificadas: se ha descrito la preparación de las células infectadas clasificadas (Denesvre *et al.*, 2007). Después de la incubación durante 1 h 30 a 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , los inóculos (células clasificadas) se eliminaron y las células ESCDL-1 fueron colocadas de nuevo en un medio DMEM/F12 que contenía 1% de SVF, 1,5% de SP y 0,3 mM de ácido ascórbico. Las células BP25 inducidas se colocaron de nuevo en WE 1-1,5% con los inductores a las concentraciones descritas.

iii. Utilización de linfocitos transformados: las células NWB o 3867K se centrifugaron, se colocaron en un medio de baja concentración de suero fetal (DMEM/F12) y se inocularon en un tapiz confluyente de células ESCDL-1. Después de una incubación durante 1h 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ , el inóculo

se eliminó y el medio se reemplazó por el medio DMEM/F12 que contenía 1% de SVF, 1,5% de SP y 0,3 mM de ácido ascórbico.

iv. Congelación de los inóculos: en todos los casos, los inóculos se prepararon a partir de tapices de células infectadas que tenían un efecto citopático máximo. Después de tripsinación y de centrifugación (200 x g, durante 10 minutos), los residuos celulares se recogieron en un medio de congelación compuesto por 95% de SVF y 5% de DMSO, y las células se distribuyeron en criotubos según una proporción de 3 tubos/placa de 75 cm<sup>2</sup>. Después de 24 horas en una placa isotérmica a -80°C, los tubos se transfirieron a nitrógeno líquido.

b. Titulaciones: Las titulaciones se efectuaron sobre tapices celulares 48 horas después de la inoculación, sobre células primarias (CESkC) o células ESCDL-1. El procedimiento descrito anteriormente (Blondeau *et al.*, 2008) se adaptó al contexto de las células ESCDL-1, en que el medio DMEM/F12 fue sustituido por WE y en que, después de la inoculación, los tapices celulares se colocaron en un medio semisólido compuesto por DMEM/F12 o por WE que contenía 1% de metilcelulosa (metilcelulosa, ref. 25 449.182 - VWR-Prolabo), 1% de SVF, 1,5% de SP y 3 mM de ácido ascórbico (ESCDL-1). Después de 3 días (Bac20 y mutantes) o 4 días (RB-1B y mutantes), los tapices celulares se fijaron por incubación en presencia de una solución de paraformaldehído (ref. P6148 - Sigma Aldrich - Francia) con 4% de tampón PBS durante 20 minutos, a temperatura ambiente. Después se eliminó la solución de fijación y los tapices se enjuagaron en PBS. Para detectar los antígenos virales, las células se permeabilizaron y se realizó la reacción de inmunofluorescencia según un protocolo descrito (Dorange *et al.*, 2000). La medición de los tamaños de las zonas en diferentes contextos celulares se realizó según el protocolo descrito por N. Richerieux (Richerieux *et al.*, 2012), en un número medio de 80 zonas individualizadas.

c. Carga viral: El número de copias de genoma viral por célula se calculó usando una reacción de PCR cuantitativa (qPCR) de tipo Taqman, según el protocolo descrito por K. Jarosinski (Jarosinski *et al.*, 2002). Brevemente, el gen celular iNOS y el gen viral ICP4 se cuantificaron en las muestras con la ayuda de un par de iniciadores y de una sonda específica para cada gen. (Tabla 2). Con el fin de cuantificar las mediciones del número de copias se utilizó una gama de dilución con un número conocido de copias de ADN de cada gen objetivo. El estándar iNOS es un plásmido pBS-iNOS (donación de K. Jarosinski) ajustado a una concentración de 5 ng/μl, almacenado a -20°C. El estándar ICP4 es un bácmido BAC-20 ajustado a 50 ng/μl, almacenado a 4°C. Las gamas de dilución de los estándares se realizan de 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-7</sup> en agua. Las qPCR se efectuaron en placas de 96 pocillos con el kit Absolute-Blue qPCR Mix&ROX kit (ABgene), los pares de cebadores así como las sondas (Eurogentec). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 μl (10 μl de Mix Fast Blue 2X + 0,10 μl de cada cebador a 100 μM + 0,5 μl de sonda a 10 μM + 9,5 μl d ADN).

#### 7. Detección de los antígenos celulares y virales.

a. Inmunofluorescencia: Las células se cultivaron sobre lámina de vidrio de 14 mm de diámetro y 0,17 mm de espesor (Marienfeld - VWR - Francia), en placa de 24 pocillos (ref. 353935 BD Falcon - Francia) después de que las láminas se incubaran en gelatina al 0,1% en PBS durante 30 minutos. Las células se fijaron en paraformaldehído al 4%. Se han descrito las condiciones de realización de la reacción de inmunofluorescencia sobre células fijadas y permeabilizadas (Chbab *et al.*, 2009). En las células no permeabilizadas, todas las incubaciones se realizaron en tampón PBS que contenía 2% de albúmina de suero bovino (BSA) (bovine serum albumin, fracción V - PAA - Francia). Los anticuerpos primarios usados se describen en la tabla 1. Los anticuerpos secundarios utilizados, anti IgG de ratón, anti IgG de conejo o anti IgG de pollo, se acoplaron con Alexa 488 o 594 (Molecular Probes - Invitrogen - Francia). La actina polimerizada (F-actina) se marcó con faloidina acoplada con Alexa 594 (Ref. A12381 - Molecular Probes - Invitrogen - Francia). Las fotografías se tomaron con un microscopio Zeiss Axiovert 200M® equipado con un Colibri II®, un dispositivo Apotome® Zeiss de una cámara AxioCam MRm Zeiss®, y controlado por el programa Axiovision (Carl Zeiss SA - Francia).

b. Inmunoimpresión (WB). Las condiciones en las que se detectaron los antígenos virales a partir de extractos de células ESCDL-1 fueron las mismas que las descritas para las células primarias (Chbab *et al.*, 2009).

8. Microscopía de transmisión electrónica: las células ESCDL-1 en la pasada 25 se infectaron por un virus Bac20 en la pasada 3 después de transfección sobre estas mismas células. Las células se cultivaron en una placa de 6 pocillos UpCell (Nunc UpCell surface Ref. 174901 - Thermo Scientific - Francia) en las condiciones descritas (véase más arriba), infectadas (o "mock" infectadas para las células controles), y los tapices se recuperaron según el protocolo descrito por el fabricante para ser fijadas a continuación en el fijador de Trump. Las células infectadas o no infectadas se prepararon para el examen por microscopía electrónica según un protocolo descrito anteriormente (Denesvre *et al.*, 2007).

## Resultados

### Ejemplo 1. Aislamiento de la línea ESCDL-1

5 El establecimiento de una línea permisiva a partir de las células BP25 se realizó según una lógica de inducción basada en la exposición sucesiva a unas matrices extracelulares complejas que se derivan de células permisivas (Stromal cell-derived inducing activity - SDIA - (Kawasaki *et al.*, 2000)), y a la acción de citodiferenciación de la HMBA. La preparación de las matrices extracelulares a partir de las células primarias de piel de pollo se efectuó según el protocolo descrito por Coraux (Coraux *et al.*, 2003). Los soportes de cultivo obtenidos se almacenaron 10 45 días a 4°C y se verificó la ausencia de crecimiento celular al final de este almacenamiento. El día 0 de la inducción, las células madre se inocularon en una caja de Petri que contenía la matriz extracelular, a razón de 26500 células/cm<sup>2</sup>, en un medio WE que contenía 10% de SVF (figura 1). Después de un ciclo de exposición a unas concentraciones reducidas de suero y 2 tripsinaciones, las células en la pasada 3 se expusieron durante 3 días a la acción de la HMBA (5 mM) en un medio WE que contenía 1% de SVF y 1,5% de SP. La continuación 15 del protocolo de establecimiento (figura 1) se desarrolló durante un periodo de 25 días, ha implicado 3 tripsinaciones que dan como resultado la pasada 6 después del establecimiento del cultivo. Las células se transfirieron entonces a un medio DMEM/F12 que contenía 10% de SVF, un medio en el que se cultivaron a continuación. El ritmo de tripsinación pasó de 1 por semana (pasadas 6 y 7) a 2 por semana para la pasada 8 y siguientes, con una inoculación media de 45000 células por cm<sup>2</sup>. En paralelo al establecimiento de la línea, la permisividad de la replicación viral se probó de forma puntual en la pasada 13, revelando una multiplicación del virus Bac20 en las células ESCDL-1. La línea se consideró establecida a partir de la pasada 23 y se prepararon unos inventarios de células congeladas a partir de la pasada 18.

### Ejemplo 2. Caracterización de la línea ESCDL-1

25 Las células ESCDL-1 tienen una morfología más bien fibroblástica (figura 2), su periodo de duplicación es de aproximadamente 40 horas y parecen mostrar una pérdida progresiva de su potencial de proliferación a partir de la pasada 100. Su curva de crecimiento se muestra en la figura 3.

30 La filiación entre BP25-36b y ESCDL-1 se verificó de manera que se estableciera que las células no se derivaban de la persistencia de células vivas de entre las células que habían servido para establecer la matriz extracelular. Como las células BP25 se obtuvieron a partir de embriones de pollo de cuello desnudo (Pain *et al.*, 1996), los presentes inventores usaron una PCR que diferencia los animales LD1 de los animales de cuello desnudo (Mou *et al.*, 2011) en ADN genómicos extraídos de las células madre (BP25), de las ESCDL-1 (P38) y de las células 35 primarias de piel embrionarias (gallinas LD1). El análisis de los fragmentos obtenidos mostró que las BP25, como las ESCDL-1, se derivaban de un embrión del genotipo de cuello desnudo (heterocigoto - Na/na), mientras que las células primarias procedían de un genotipo "wt" (homocigoto na/na).

40 La figura 4 representa la detección de los ARN mensajeros de los marcadores Oct4 y NANOG en las células BP25 y ESCDL-1, por medio de la técnica RT PCR. Solo las células madre BP25 expresan los ARNm de los marcadores OCT4 (7) y NANOG (12). Estos ARNm son indetectables en las células ESCDL-1 (pocillos 10 y 15). La detección de los ARNm de la GAPDH en todas las preparaciones de ARN (1 a 5) atestigua la calidad uniforme de las preparaciones de ARNm de piel (1-6-11), células madre BP25 (2-7-12), hígado (3-8-13), riñón (4-9-14) y células ESCDL-1 (5-10-5). Estos resultados se confirmaron en qRT PCR. En inmunofluorescencia resultó 45 imposible visualizar la expresión de otros marcadores de células madre en las ESCDL-1 (Tabla 1).

Tabla 1: Comparación de la expresión de los marcadores de pluripotencia sobre las células BP25 y las ESCDL-1 (las células MDCK se utilizaron como control). Los antígenos membranares SSEA-1 (característicos de las células ES) y EMA-1 (considerados como un buen marcador de células PGC) se detectaron en las células BP25 50 por inmunofluorescencia indirecta, mientras que las ESCDL-1 no presentaban ningún marcado.

Anticuerpo	Especificidad	Células (no permeabilizadas)		
		ESCDL-1 P39	BP25	MDCK P22
IXF1	Marcador de células madre epiteliales	-	+	-
MC480	SSEA-1	-	+	-
EMA-1	marcador de PGC	-	+	-
TROMA-1	CytoK-EndoA	-	-	+ †?

Finalmente, se midió la actividad telomerasa en las ESCDL-1 en comparación con las células LMH (control positivo) y otras líneas celulares (DF1 y CLEC) y células primarias (CES kC); puede ser detectada una actividad 55 baja, comparable a la observada para las células DF1 y CLEC (Esnault *et al.*, 2011), pero considerablemente inferior a la observada en las células LMH.

Se realizó un análisis comparativo por RT-PCR (Lavial *et al.*, 2007) de la expresión de genes de pluripotencia (5a) y de genes marcadores de los fibroblastos (5b) entre las células DF1, LMH, CEF, cES (BP25) y ESCDL-1 60 obtenidas según la invención, en cuanto a la presencia de ciertos marcadores. Los cebadores utilizados para

este análisis se indican en la tabla 2 siguiente. Los resultados de este análisis se agrupan en las figuras 5a y 5b.

Tabla 2

Nombre del gen	ID del gen	Sentido	Antisentido
AP1 S3	<u>424807</u>	TGCGGTGAAAAGCCATGGAAGAC	GCAGGTGTGTACAGCAGTTCTCTT TCC
cPOUV/OCT 4	<u>427781</u>	TGCAATGCAGAGCAAGTGCTGG	ACTGGGCTTCACACATTTGCGG
ECM2	<u>415953</u>	GTCAGAAATTTGCTTTAACCACAC AAG	TTTATCCAAGCCAAAGGTGCTATT C
EDN2	<u>419559</u>	CTGGAGCCCAAGGCAGACGC	GGCCAGTGATGCGGGCACTT
HELLS	<u>423750</u>	AAGCTCTGCTGGCAACCTGTGTC	AGGAACTGCTTGGCACTGTGTGCG
KRT19	<u>395861</u>	GGCTTCGGTGGTGGCTATGG	AGGACGCGAGGCGGTTCATTC
KRT8	<u>426896</u>	CCGGCAGCTGCGTGAGTACC	CGTGGTCCGGGTGTGGATGC
NANOG	<u>100272166</u>	TGCACACCAGGCTTACAGCAGTG	TGCTGGGTGTTGCAGCTTGTTTC
OLFM3	<u>424461</u>	TGGGCAGGAACCAACCACGTT	GTGCAAGCACCCGCCAGTA
RSP17	<u>374053</u>	ACACCCGTCTGGGCAACGAC	CCCGCTGGATGCGCTTCATC
THBS2	<u>414837</u>	GTGGAAGCAGGTCACCTCAAAC	CCCCAGTACCAGTTGTTGAATTC
WISP1	<u>420322</u>	AGCCCAACTGCAAATACAACCTG	TGAGTTTGTGCACATGGGAATG

5

### Ejemplo 3. Permisividad de células ESCDL-1 para la replicación de virus aviares

Los virus estudiados son los siguientes:

10

#### 1. Virus atenuados adaptados al cultivo de célula:

15

El virus Bac20 y derivados: el virus Bac20 UL17mRFP (Chbab *et al.*, 2009) sirvió como herramienta principal de estudio de la permisividad, debido a la facilidad de su manipulación (proteína fluorescente roja fusionada con la proteína UL17) y a la conservación de sus características de multiplicación con respecto al virus parental (Bac20 no etiquetado). También se transfectaron los báculos que codifican para los virus Bac20 y Bac20EGFPUL49 (Blondeau *et al.*, 2008) en las células ESCDL-1. También se utilizó la infección con las células infectadas (células primarias de piel de pollo) por el virus Bac20-EGFPUL49 (Denesvre *et al.*, 2007)

20

El virus MeHV-1: el virus MeHV-1 cepa FC126 se inoculó en las células ESCDL-1 a partir de una preparación vacunal liofilizada (sin células primarias).

25

#### 2. Virus patógenos: virus que se derivan de los báculos RB-1B.

30

Virus RB-1B y RB-1BUL17mRFP: transfección de báculos en las células ESCDL-1

Virus RB-1B UL47GFP: transmisión de la infección viral a partir de las células T transformadas (NWB o 3867K) aisladas de animales infectados por el virus descrito por Jarosinsky *et al.* (Jarosinski *et al.*, 2012)

35

### Ejemplo 3A. Bac 20 UL17mRFP

Las pruebas se realizaron en un primer momento con virus adaptados al cultivo celular, derivados del báculo que codifica para el genoma del virus Bac20. La transfección de un báculo en las células ESCDL-1 ofrece un modelo de estudio diferente del de las células primarias.

Pasadas en serie y titulaciones comparativas en células primarias y ESCDL-1:

40

Tabla 3

Pasada	Relación de división*	Duración de incubación	Número de tubos congelados	Título (UFP/ml)	
				CESkC†	ESCDL-1
T1**	5,4 µg Báculo/ 4,5 10 <sup>6</sup> células	7 días			250 UFP°
P1	1/6	5	3	ND	ND
P2	1/5	4	4	(2,6±0,79)*10 <sup>5</sup>	(2,12±0,71)x10 <sup>5</sup>
P3	1/20	6	3	(3,4±0,79)*10 <sup>5</sup>	(3,05±0,79)x10 <sup>5</sup>
P4*	1/20	6	3		(1,09±0,4)x10 <sup>5</sup>

Pasada	Relación de división*	Duración de incubación	Número de tubos congelados	Título (UFP/ml)	
				CESkC†	ESCDL-1
P5	1/10	5	6		$(1,16 \pm 0,09) \times 10^5$
P6	1/30	5	6	$(5,5 \pm 0,8) \times 10^4$	$(5,2 \pm 0,8) \times 10^4$

†: CESkC: células primarias de piel embrionaria de pollo

P4\*: pasada en la que se midió la carga viral en los dos sistemas de producción (CESkC o ESCDL-1)

5 La replicación del virus Bac20 UL17mRFP en ESCDL-1 desemboca en la obtención de títulos infecciosos del orden de 1 a  $5 \times 10^5$  UFP/ml, desde la segunda pasada del virus por este sistema celular.

10 La carga viral (número de copias de genomas virales/célula) medida en la pasada 4 era equivalente en los 2 sistemas de producción ( $3$  a  $8 \times 10^3$  copias del genoma viral por célula en las células CESkC, y  $2,4$  a  $10 \times 10^3$  para las ESCDL-1)

Bac20 UL17mRFP: Progenie viral de título equivalente en las CEPP y en las ESCDL-1 en diferentes condiciones del medio de cultivo de las células

15 Los resultados se muestran en la figura 5: Las ESCDL-1 tienen una capacidad para replicar el virus equivalente a la de las células primarias (CES kC).

Bac20 UL17mRFP: Diseminación viral equivalente en las CESkC y en las ESCDL-1

20 Los resultados se muestran en la figura 7. El análisis del tamaño de las zonas inducidas por la multiplicación del virus en las CESkC o en las ESCDL-1 muestra una distribución y un tamaño equivalente para un mismo inóculo en los 2 sistemas celulares, independientemente de las condiciones del medio ensayadas.

25 **Ejemplo 3B. Bac20 EGFP-UL49 y Bac20**

La transfección de bácmidos en las células ESCDL-1 permite volver a aislar unos virus replicativos, y se traduce por la aparición de un efecto citopatógeno (zonas de células infectadas) desde el 4º día tras la transfección.

30 El virus Bac20 obtenido a partir de la transfección del bácmido se replica en las células ESCDL-1, y las etapas principales de la morfogénesis viral permanecen similares a las descritas en las CESkC.

35 Como se muestra en la tabla siguiente, las células ESCDL-1 infectadas por el virus Bac20 presentan unas cápsides intranucleares de tipo A, B y C, unas cápsides C intracitoplásmicas y unas cápsides envueltas entre las membranas nucleares internas y externas.

Tabla 4. Análisis de la distribución de las cápsides en las células infectadas:

Cápsides A+B+C intranucleares	Cápsides perinucleares	Cápsides no envueltas intracitoplásmicas	Cápsides con tegumentos intracitoplásmicas	Cápsides envueltas intracitoplásmicas	Total
656	54	356	14	4	1084
60,52%	4,98%	32,84%	1,29%	0,37%	100%

40 El recuento de 1084 cápsides en 20 células ESCDL-1 permite detectar sin embargo una distribución ligeramente diferente de la descrita para las CESkC, sin duda relacionada con la diferencia de concepción del experimento. Sin embargo es interesante constatar que los porcentajes de cápsides envueltas intracitoplásmicas (cápsides maduras) son idénticas en los 2 modelos celulares (Denésvre *et al.*, 2007).

45 **Ejemplo 3C. BacRB-1B:**

En el marco del desarrollo de una línea permisiva para la replicación de los Mardivirus, era importante verificar que esta línea permitía la replicación de virus completamente patógenos, derivados de los BacRB-1B (Petherbridge *et al.*, 2004). La transfección del bácmido que codifica para el virus RB-1B etiquetado por la mRFP sobre la proteína UL17, se ha traducido por la aparición de un efecto citopatógeno (ECP) viral desde el 4º día tras la transfección. Después de 3 pasadas consecutivas por ESCDL-1, este virus fue titulado en CESkC y en ESCDL-1; los títulos calculados son similares ( $2,5$  a  $3,5 \times 10^5$  UFP/ml), y en la media observada habitualmente para este tipo de virus producido en células primarias (sustrato celular "estándar"). Los presentes inventores también ensayaron las posibilidades de transmisión de la infección viral a partir de células linfoides NWB y 3867K. El co-cultivo de células transformadas que reactivan el virus RB-1B UL47GFP con las células ESCDL-1 resulta en la infección de las células y en la pasada del virus a ciclo lítico en las ESCDL-1.

**Ejemplo 3D. El virus MeHV1**

5 El virus se inoculó en las células ESCDL-1 en las condiciones indicadas y esta inoculación se traduce por la aparición de un efecto citopatógeno. El virus resultante de esta primera pasada fue titulado en CESkC y ESCDL-1. Los títulos virales, medidos en UFP, son idénticos ( $4,05 \pm 0,9 \times 10^4$ ).

**Ejemplo 3E. El Birnavirus**

10 El virus IBDV de la cepa CT (cepa CT, número de registro GENBANK EMBL AJ310185) adaptado al cultivo celular se produjo o bien en CEPP, o bien en ESCDL-1 y la progenie viral se tituló en una dilución límite en los 2 sistemas celulares. Los títulos obtenidos son  $1 \times 10^{6,79}$  TCID50 en las CESkC, y  $1 \times 10^{6,77}$  TCID50 en las ESCDL-1.

15 El resultado de la titulación de los virus IBDV producidos en las células primarias (IBDV-PP1H+ o H-) o en las células ESCDL-1 (IBDV-ESCDL-1 34 o 69H+ o H-) en las células secundarias (PP2) o en las ESCDL-1 en la pasada 39 se presenta en la tabla 5 siguiente:

Virus IBDV producido en	Células utilizadas para la titulación	
	CESkC (P2)†	ESCDL-1 P39
CESkC	$1 \times 10^{6,79}$	$1 \times 10^{7,03}$
ESCDL-1 P34	$1 \times 10^{6,77}$	$1 \times 10^{6,77}$
ESCDL-1 P69	$1 \times 10^{6,65}$	$1 \times 10^{6,53}$

20 †: CESkC P2: células secundarias obtenidas por tripsinación y nueva puesta en cultivo de las CESkC.

Esta tabla da una idea de la estabilidad del fenotipo de las ESCDL-1, que resultan también sensibles a la infección por el IBDV en las pasadas 34 o 69. Los títulos virales (calculados según el procedimiento de Reed y Muench) son similares entre las CESkC y las ESCDL-1.

**Ejemplo 4. Transfección de la línea ESCDL-1****Ejemplo 4A. ESCDL-1 Venus: línea que expresa una EYFP**

30 Las células ESCDL-1 en la pasada 21 se contransfectaron por el plásmido pCS2Venus y el plásmido pTK-Hyg2 (resistencia a la higromicina) en una relación molar de 20 moléculas de pCS2Venus/1 molécula de pTK-Hyg2. Después de la transfección (Nucleofector Amaxa - kit Basic Fibroblast - programa F024), las células se seleccionaron en higromicina (80 µg/ml). Las ESCDL-1\_Venus obtenidas después de clonación expresan fuertemente la proteína fluorescente, que se localiza en el citoplasma y el núcleo, y replican los Mardivirus.

35 Las células ESCDL-1\_Venus pueden servir así como sustrato para el estudio de las condiciones de transmisión de la infección viral (transmisión de célula a célula).

**Ejemplo 4B. ESCDL-1 UL37: línea de transcomplementación para un gen viral esencial**

40 Se produjeron varios bácmidos que codifican para virus que comprenden unas mutaciones que invalidan un gen esencial, UL37, que codifica una proteína de tegumento. Las mutaciones se refieren a la totalidad del gen (delección) o a 2 codones que codifican para 2 leucinas participantes de un motivo "pseudo leucine zipper", motivo conservado en numerosos ortólogos de UL37 (gen conservado en todos los herpesvirus). Se seleccionaron y se ensayaron unas líneas ESCDL-1 transfectadas por un pCDNA3-UL37 (ESCDL-1\_37) o pCDNA3-UL37-mut (ESCDL-1\_37mut) para determinar su capacidad de replicar los virus mutantes y parentales a partir de los bácmidos transfectados. Se pudo observar la formación de zonas y la génesis de una progenie viral para los 2 virus mutados (delección y mutación puntual) en las células ESCDL-1\_37 solas. Ni las ESCDL-1 ni las ESCDL-1\_37mut que expresan la proteína mutada pueden complementar los virus mutantes.

50 En el contexto científico actual, la línea ESCDL-1 parece ser la única línea "utilizable" para este tipo de estudio, al no presentar las células QM7 descritas anteriormente (Schumacher *et al.*, 2002) una permisividad equivalente para el conjunto de los Mardivirus.

**Ejemplo 4C. ESCDL-1 Lc3-GFP y LBR-GFP: clones celulares que expresan proteínas celulares fusionadas con EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)**

60 Se generaron diferentes clones ESCDL-1 que expresan las proteínas Lc3-EGFP (marcador de autofagia) y LBR-EGFP (receptor de la lámina B). Gracias a una expresión estable del transgén, estas líneas permiten estudiar la respuesta celular (autofagia y desestabilización de la lámina nuclear) en procesos patológicos, en particular durante infecciones por virus ADN y ARN (por ejemplo, los influenza aviares capaces de activar los procesos autofágicos). El interés principal de estas líneas estables es seguir en tiempo real la relocalización de las proteínas Lc3 y LBR en la célula durante la infección.

También se obtuvieron las ESCDL-1 que expresan una recombinasa, la flippasa; se estableció la expresión del transgén y la actividad de lipasa está en curso de caracterización.

- 5 Debido a la facilidad y a la rapidez de establecimiento de las líneas ESCDL-1 que expresan proteínas celulares etiquetadas (aproximadamente 1 mes), se puede contemplar la extensión de este sistema a un panel más amplio de proteínas.

**Referencias**

10

Patentes

- 15 WO 2007/110343  
 WO 98/006824  
 EP 2 572 728  
 EP 0 775 743

No patentes

- 20 Blondeau, Marc, Courvoisier, Vautherot & Denesvre (2008). Functional homologies between avian and human alpha-herpesvirus VP22 proteins in cell-to-cell spreading as revealed by a new cis-complementation assay. *J Virol* 82, 9278-9282.

- 25 Chbab, Chabanne-Vautherot, Francineau, Osterrieder, Denesvre & Vautherot (2009). The Marek's disease virus (MDV) protein encoded by the UL17 ortholog is essential for virus growth. *Vet Res* 40, 28.

Churchill (1968). herpes-type virus isolated in cell culture from tumours of chickens with Marek's disease. I. Studies in cell culture. *J Natl Cancer Inst* 41, 939-950.

- 30 Coraux, Hilmi, Rouleau, Spadafora, Hinnrasky, Ortonne, Dani & Aberdam (2003). Reconstituted skin from murine embryonic stem cells. *Curr Biol* 13, 849-853.

- 35 Correia, Anisimov, Li & Brundin (2008). Growth Factors and Feeder Cells Promote Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Dopaminergic Neurons: A Novel Role for Fibroblast Growth Factor-20. *Front Neurosci*, 2, 26-34.

Denesvre, Blondeau, Lemesle, Le Vern, Vautherot, Roingard & Vautherot (2007). Morphogenesis of a highly replicative EGFPVP22 recombinant Marek's disease virus in cell culture. *J Virol* 81, 12348-12359.

- 40 Dorange, El Mehdaoui, Pichon, Coursaget & Vautherot (2000). Marek's disease virus (MDV) homologues of herpes simplex virus type 1 UL49 (VP22) and UL48 (VP16) genes: high-level expression and characterization of MDV-1 VP22 and VP16. *J Gen Virol* 81, 2219-2230.

- 45 Esnault, Bonsergent, Larcher, Bed'hom, Vautherot, Delaleu, Guigand, Soubieux, Marc & Quéré (2011). A novel chicken lung epithelial cell line: Characterization and response to low pathogenicity avian influenza virus. *Virus Res* 159, 32-42.

- 50 Eyal-Giladi & Kovak (1976). From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick; I. General Morphology. *Dev. Biol* 49, 321-337.

Fuchs & Mettenleiter (1999). DNA sequence of the UL6 to UL20 genes of infectious laryngotracheitis virus and characterization of the UL10 gene product as a nonglycosylated and nonessential virion protein. *J Gen Virol* 80 ( Pt 8), 2173-2182.

- 55 Geerligs, Quanz, Suurland, Spijkers, Rodenberg, Davelaar, Jongmsma, Kumar (2008). Efficacy and safety of cell associated vaccines against Marek's disease virus grown in a continuous cell line from chickens. *Vaccine*. 26, 5595-5600.

- 60 Jarosinski, Arndt, Kaufer & Osterrieder (2012). Fluorescently tagged pUL47 of Marek's disease virus reveals differential tissue expression of the tegument protein in vivo. *J Virol* 86, 2428-2436.

Jarosinski, Margulis, Kamil, Spatz, Nair & Osterrieder (2007). Horizontal transmission of Marek's disease virus requires US2, the UL13 protein kinase, and gC. *J Virol* 81, 10575-10587.

- 65 Jarosinski, Yunis, O'Connell, Markowski-Grimsrud & Schat (2002). Influence of genetic resistance of the chicken and virulence of Marek's disease virus (MDV) on nitric oxide responses after MDV infection. *Avian Dis* 46, 636-649.

- Kawaguchi, Nomura, Hirayama & Kitagawa (1987). Establishment and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH. *Cancer Res*, 47, 4460-4463.
- 5 Kawasaki, Mizuseki, Nishikawa, Kaneko, Kuwana, Nakanishi, Nishikawa & Sasai (2000). Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28, 31-40.
- Lavial, Acloque, Bertocchini, Macleod, Boast, Bachelard, Montillet, Thenot, Sang, Stern, Samarut & Pain  
10 (2007). The Oct4 homologue PouV and Nanog regulate pluripotency in chicken embryonic stem cells. *Development*, 134, 3549-3563.
- Lee, Foster, Bottje, Jang, Chandra, Gentles & Kong. (2013). Establishment of an immortal chicken embryo liver-derived cell line. *Poult Sci*. 92,1604-1612
- 15 Lejal, Da Costa, Huet & Delmas (2000). Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. *J Gen Virol* 81, 983-992.
- Marks & Rifkind (1989). Induced differentiation of erythroleukemia cells by hexamethylene bisacetamide: a model for cytodifferentiation of transformed cells. *Environ Health Perspect*. 80, 181-188.
- 20 Moscovici, Moscovici, Jimenez, Lai, Hayman & Vog (1977). Continuous tissue culture cell lines derived from chemically induced tumors of Japanese quail. *Cell*. 11, 95-103.
- Mou, Pitel, Gourichon, Vignoles, Tzika, Tato, Yu, Burt, Bed'hom, Tixier-Boichard, Painter & Headon (2011). Cryptic patterning of avian skin confers a developmental facility for loss of neck feathering. *PLoS Biol* 9, e1001028.
- 25 Nakano , Kodama & Honjo (1994). Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 265, 1098-1101.
- 30 Ogura & Fujiwara.(1987). Establishment and characterization of a virus-free chick cell line. *Acta Med Okayama*. 41,141-143.
- Pain, Clark, Shen, Nakazawa, Sakurai, Samarut & Etches (1996). Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122, 2339-2348.
- 35 Panacchia, Dellambra, Bondanza, Paterna, Maurelli, Paionni & Guerra. (2010). Nonirradiated human fibroblasts and irradiated 3T3-J2 murine fibroblasts as a feeder layer for keratinocyte growth and differentiation in vitro on a fibrin substrate. *Cells Tissues Organs* 191, 21-35.
- 40 Petherbridge, Brown, Baigent, Howes, Sacco, Osterrieder & Nair (2004). Oncogenicity of virulent Marek's disease virus cloned as bacterial artificial chromosomes. *J Virol* 78, 13376-13380.
- 45 Preston & McFarlane (1998). Cytodifferentiating agents affect the replication of herpes simplex virus type 1 in the absence of functional VP16. *Virology* 249, 418-426.
- Richerieux, Blondeau, Wiedemann, Remy, Vautherot & Denesvre (2012). Rho-ROCK and Rac-PAK Signaling Pathways Have Opposing Effects on the Cell-to-Cell Spread of Marek's Disease Virus. *PLoS One* 7, e44072.
- 50 Schumacher, Tischer, Fuchs & Osterrieder (2000). Reconstitution of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) from DNA cloned as a bacterial artificial chromosome and characterization of a glycoprotein B-negative MDV-1 mutant. *J Virol* 74, 11088-11098.
- 55 Schumacher, Tischer, Teifke, Wink & Osterrieder (2002). Generation of a permanent cell line that supports efficient growth of Marek's disease virus (MDV) by constitutive expression of MDV glycoprotein E. *J Gen Virol* 83, 1987-1992.
- Solomon, Witter, Nazerian, Burmester (1968). Studies on the Etiology of Marek's Disease. I. Propagation of the Agent in Cell Culture. *Exp Biol Med* 127, 173-177
- 60 Storlie, Jackson, Hutchinson & Grose (2006). Delayed biosynthesis of varicella-zoster virus glycoprotein C: upregulation by hexamethylene bisacetamide and retinoic acid treatment of infected cells. *J Virol* 80, 9544-9556.
- 65

**Listado de secuencias**

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

5 <120> Procedimiento de selección de una línea celular permisiva para la replicación de virus aviares

<130> 366041D32442

<150> FR 1357346

10 <151> 2013-07-25

<160> 24

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> artificial

20 <220>

<223> Cebador sentido del gen AP1S3

<400> 1

25 tgcggtgaaa gccatggaag ac 22

<210> 2

<211> 27

30 <212> ADN

<213> artificial

<220>

35 <223> Cebador antisentido del gen AP1S3

<400> 2

40 gcaggtgtgt acagcagttc tctttcc 27

<210> 3

<211> 22

<212> ADN

<213> artificial

45 <220>

<223> Cebador sentido del gen cPOUV/OCT4

<400> 3

50 tgcaatgcag agcaagtgct gg 22

<210> 4

<211> 22

55 <212> ADN

<213> artificial

<220>

60 <223> Cebador antisentido del gen cPOUV/OCT4

<400> 4

actgggcttc acacattgct gg 22

65 <210> 5

<211> 27

<212> ADN

ES 2 662 344 T3

	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sentido del gen ECM2	
5	<400> 5	
	gtcagaaatt tgcttaacc acacaag	27
10	<210> 6	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador antisentido del gen ECM2	
	<400> 6	
20	ttatccaag ccaaaggcgc tattc	25
	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sentido del gen EDN2	
30	<400> 7	
	ctggagccca aggcagacgc	20
	<210> 8	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador antisentido del gen EDN2	
	<400> 8	
	ggccagtgat gcgggcactt	20
45	<210> 9	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador sentido del gen HELLS	
	<400> 9	
55	aagctctgct ggcaacctgt gtc	23
	<210> 10	
	<211> 23	
60	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Cebador antisentido del gen HELLS	
65	<400> 10	

	aggaactgct tggcactgtg tcg	23
	<210> 11	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sentido del gen KRT19	
10	<400> 11	
	ggcttcggtg gtggtatgg	20
15	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador antisentido del gen KRT19	
	<400> 12	
25	aggacgag gcggtcattc	20
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sentido del gen KRT8	
35	<400> 13	
	ccggcagctg cgtgagtacc	20
	<210> 14	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador antisentido del gen KRT8	
	<400> 14	
	cgtgtccgg gtgtgatgc	20
50	<210> 15	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador sentido del gen NANOG	
	<400> 15	
60	tgacaccag gcttacagca gtg	23
	<210> 16	
	<211> 22	
65	<212> ADN	
	<213> artificial	

ES 2 662 344 T3

	<220>		
	<223> Cebador antisentido del gen NANOG		
	<400> 16		
5	tgctgggtgt tgcagcttgt tc		22
	<210> 17		
	<211> 21		
10	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
	<223> Cebador sentido del gen OLFM3		
15	<400> 17		
	tgggcaggaa ccaaccacgt t		21
20	<210> 18		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
25	<220>		
	<223> Cebador antisentido del gen OLFM3		
	<400> 18		
30	gtgcaagcac ccgcccagta		20
	<210> 19		
	<211> 20		
	<212> ADN		
35	<213> artificial		
	<220>		
	<223> Cebador sentido del gen RSP17		
40	<400> 19		
	acaccgtct gggcaacgac		20
45	<210> 20		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
	<220>		
50	<223> Cebador antisentido del gen RSP17		
	<400> 20		
55	cccgtggat gcgcttcac		20
	<210> 21		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> artificial		
60	<220>		
	<223> Cebador sentido del gen THBS2		
	<400> 21		
65	gtggaagcag gtcactcaaa c		21

# ES 2 662 344 T3

	<210> 22	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador antisentido del gen THBS2	
	<400> 22	
10	ccccagtacc agttgtgaa ttc	23
	<210> 23	
	<211> 22	
15	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sentido del gen WISP1	
20	<400> 23	
	agcccaactg caaatacaac tg	22
25	<210> 24	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador antisentido del gen WISP1	
	<400> 24	
35	tgagttgtg cacatgggaa tg	22

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento de obtención de una línea celular aviar no transformada que permite la replicación de virus aviares *in vitro*, que comprende por lo menos las etapas siguientes:
- 10 a) puesta en cultivo de células madre embrionarias aviares en presencia de un estroma durante por lo menos 3 días;
- 10 b) cultivo en un medio de baja concentración de suero durante por lo menos 2 días;
- 10 c) cultivo en un medio de baja concentración de suero que comprende entre 1 y 10 mM de hexametileno bisacetamida (HMBA) durante por lo menos 2 días;
- 15 d) cultivo en un medio de baja concentración de suero durante por lo menos 10 días;
- 15 e) cultivo o congelación de una línea celular aviar que permite la replicación de virus aviares.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que los virus aviares son unos Mardivirus o unos Birnavirus.
- 25 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que las células madre embrionarias aviares proceden de pollo.
- 25 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que las células madre embrionarias aviares se aíslan a partir de blastodermos en los estados X a XIV.
- 30 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que después de las etapas b), c) y d), el procedimiento comprende además las etapas de cultivo de las células en un medio de crecimiento apropiado.
- 30 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la línea celular aviar obtenida tiene un fenotipo estable durante por lo menos 60 pasadas sucesivas en un medio de cultivo apropiado.
- 35 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la línea celular aviar obtenida está modificada genéticamente para expresar unas proteínas de interés.
- 40 8. Línea celular que se puede obtener mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada por que expresa los marcadores siguientes: CD44+, integrina beta1, colágeno 1 y OLFM3.
- 40 9. Línea celular según la reivindicación 8, no expresando dicha línea los marcadores siguientes: cPOUV/OCT4, nanog, SSEA1, EMA1, IXF1, KRT8 y KRT19.
- 45 10. Utilización de la línea celular según una de las reivindicaciones 8 o 9, como sustrato para la producción *in vitro* de virus aviares.
- 45 11. Utilización de la línea celular según una de las reivindicaciones 8 o 9, para titular virus aviares.
- 50 12. Procedimiento de preparación *in vitro* de una preparación vacunal, que comprende la puesta en cultivo de la línea celular según una de las reivindicaciones 8 o 9 y su infección por lo menos por un virus aviar.
- 50 13. Preparación vacunal que comprende una línea celular según una de las reivindicaciones 8 o 9, infectada por lo menos por un virus aviar.

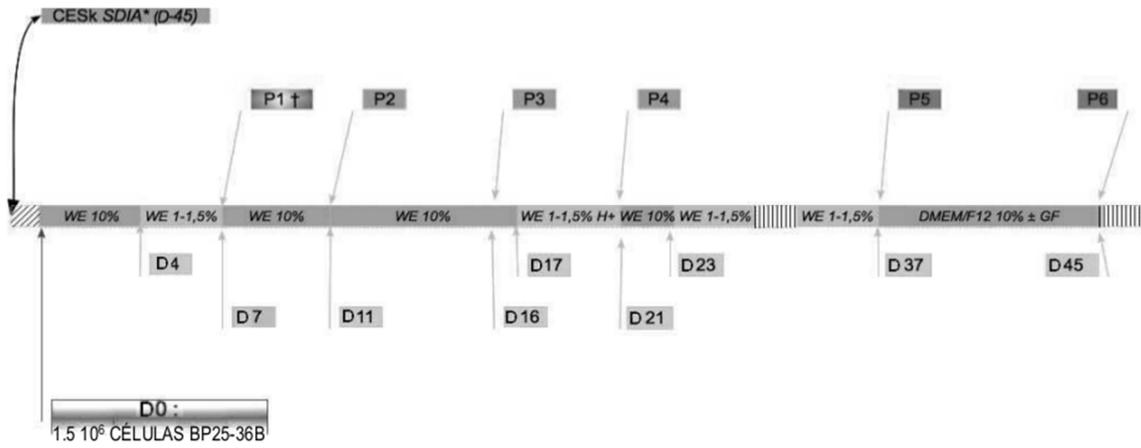


FIGURA 1

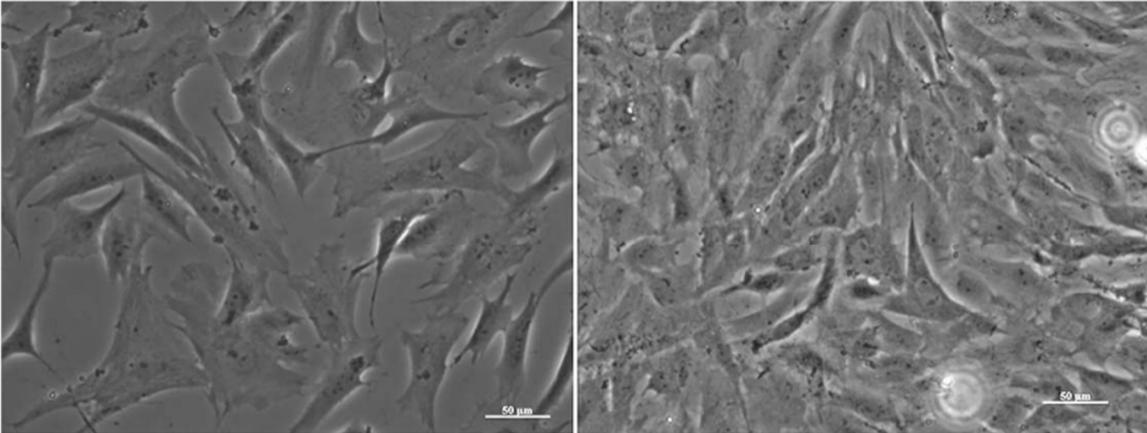


FIGURA 2

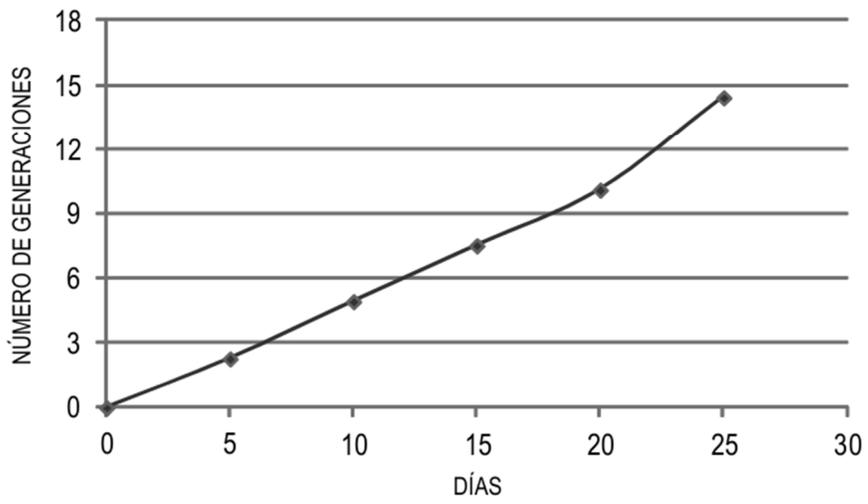
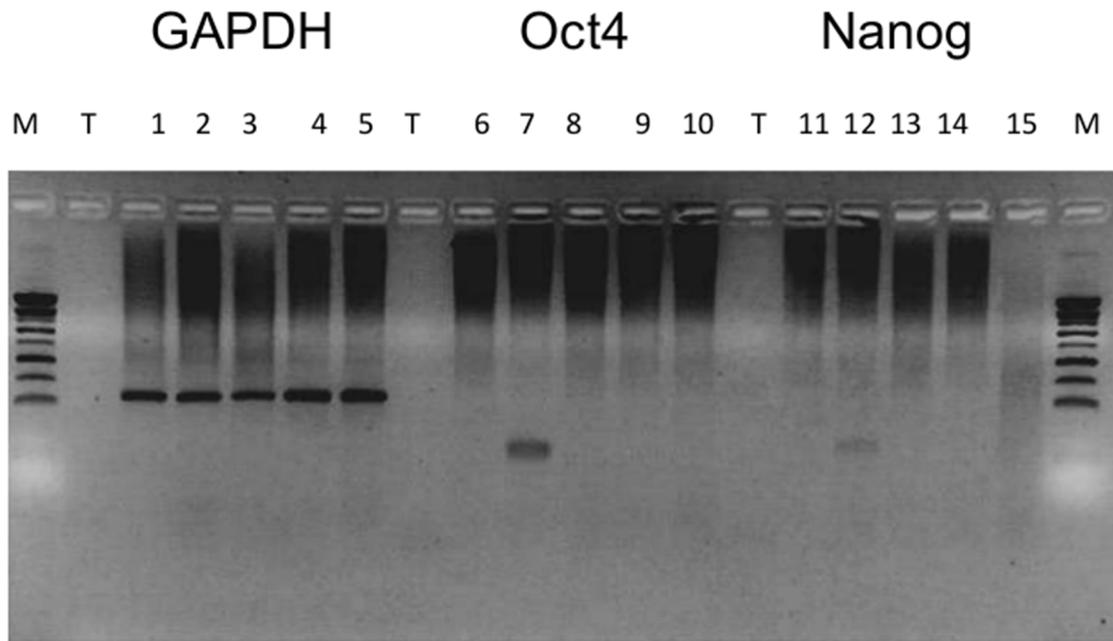


FIGURA 3



**FIGURA 4**

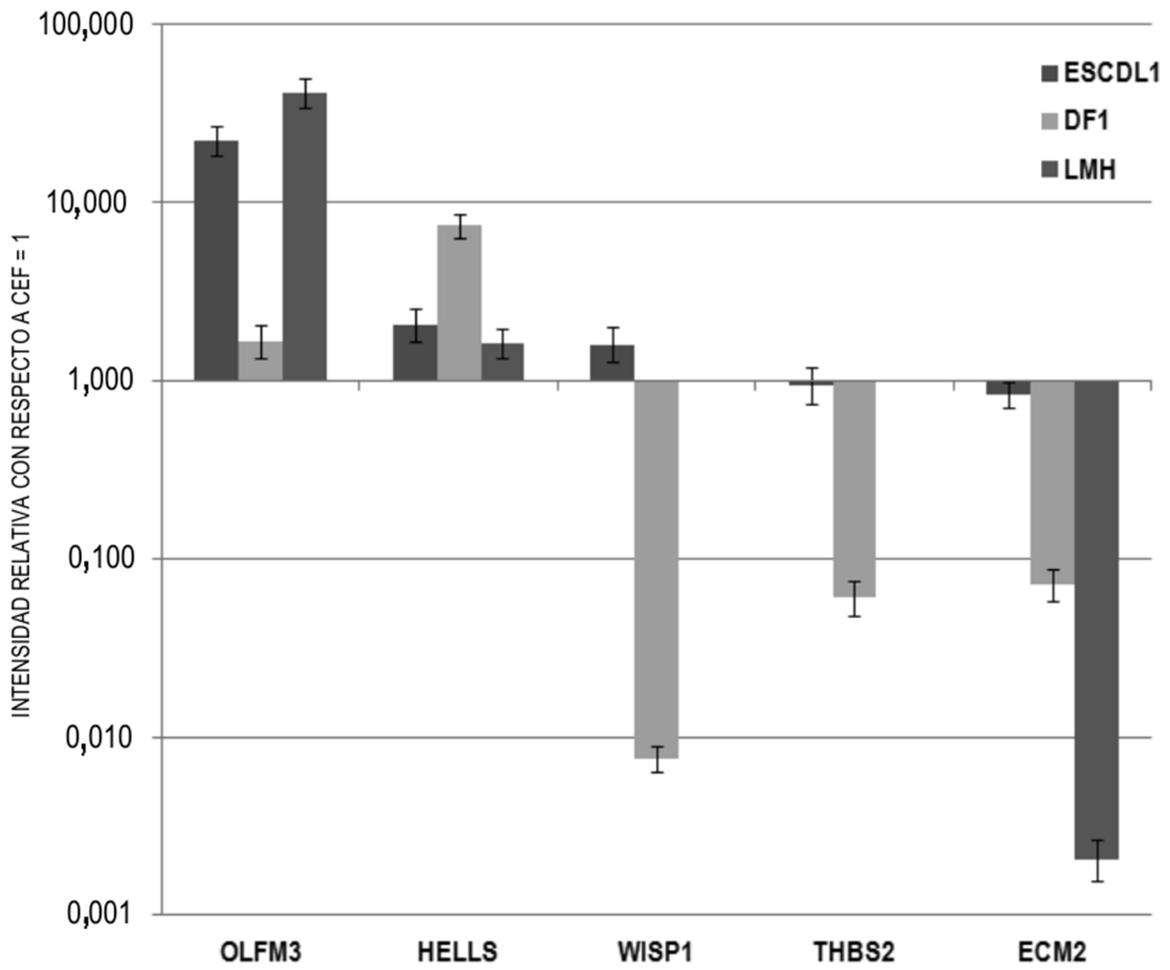


FIGURA 5A

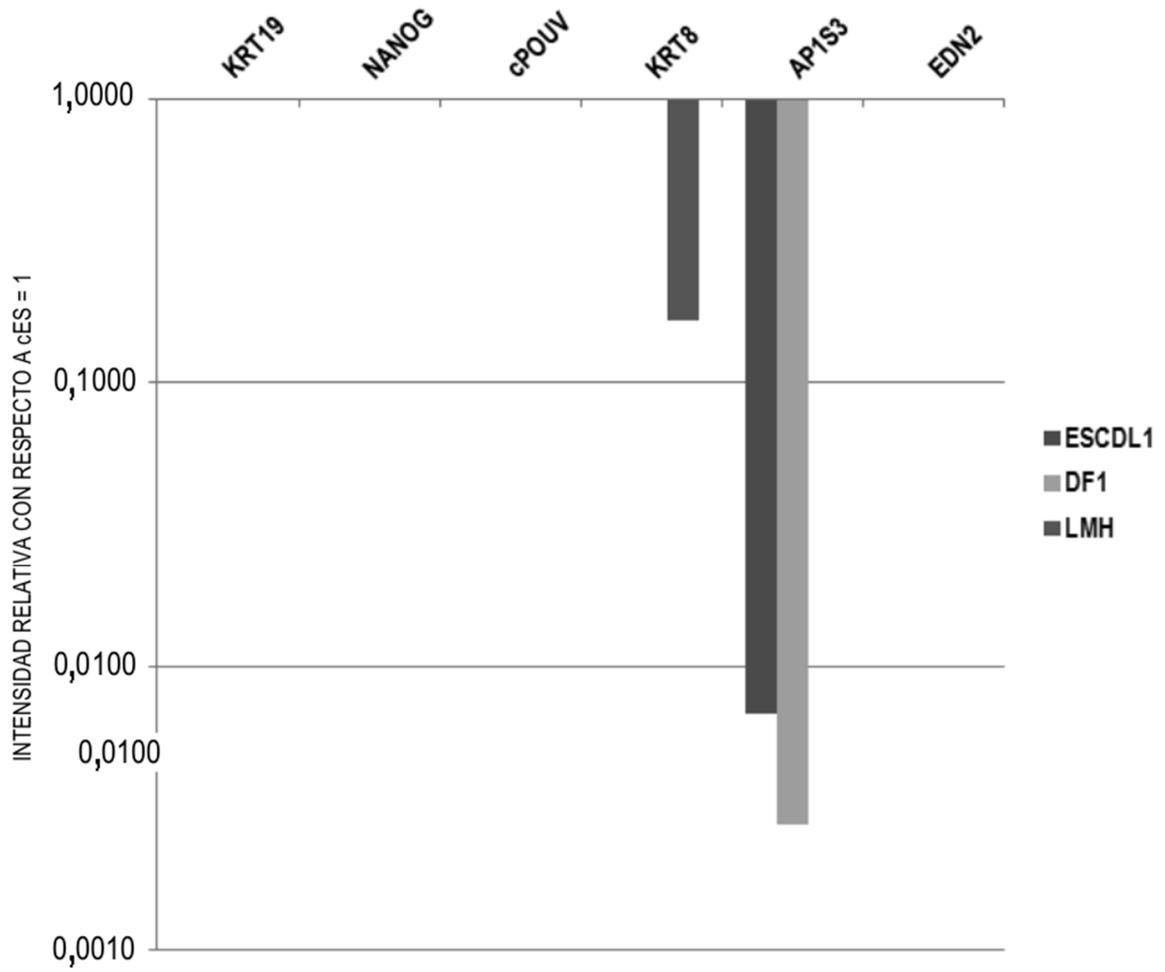


FIGURA 5B

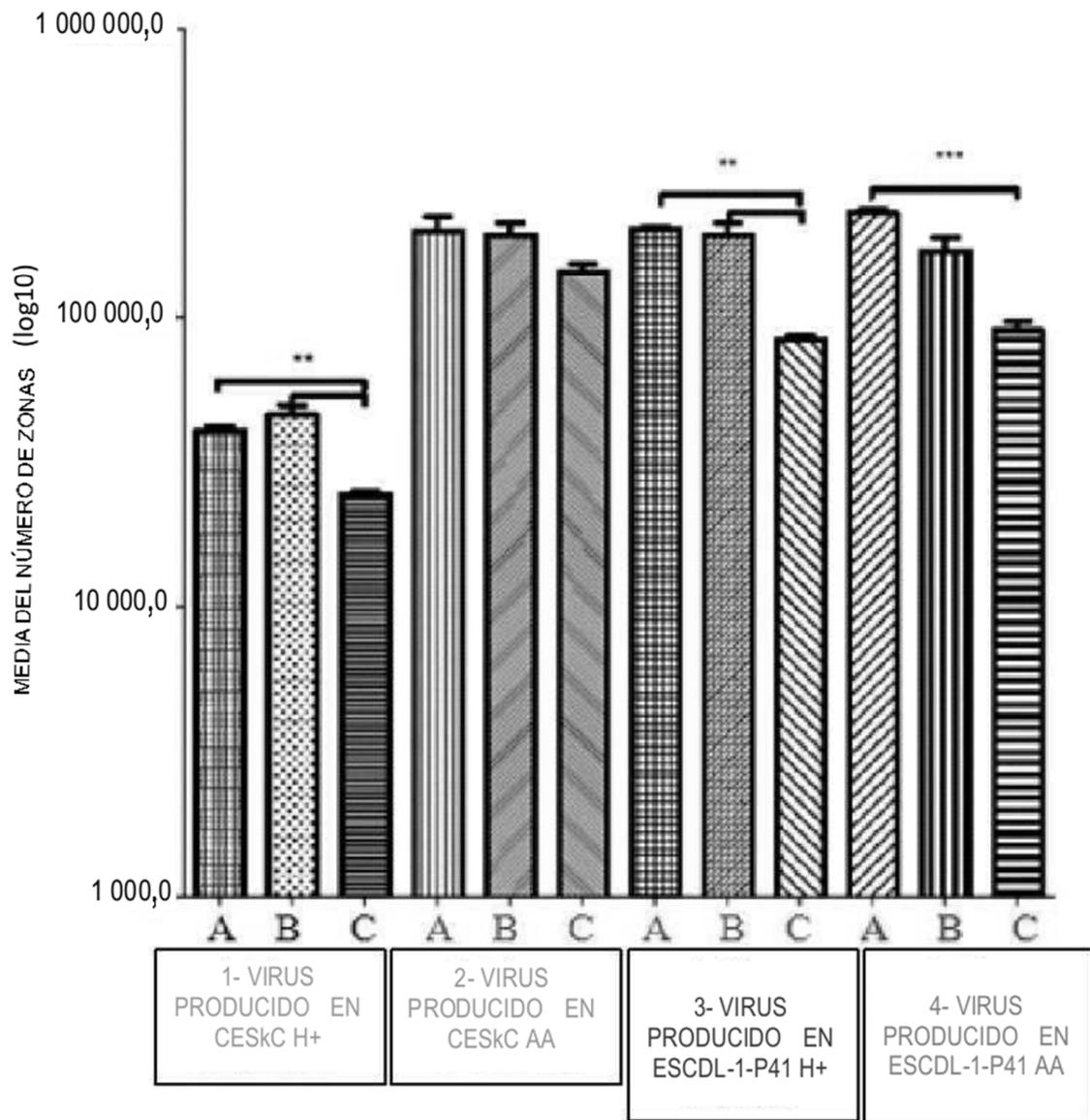


FIGURA 6

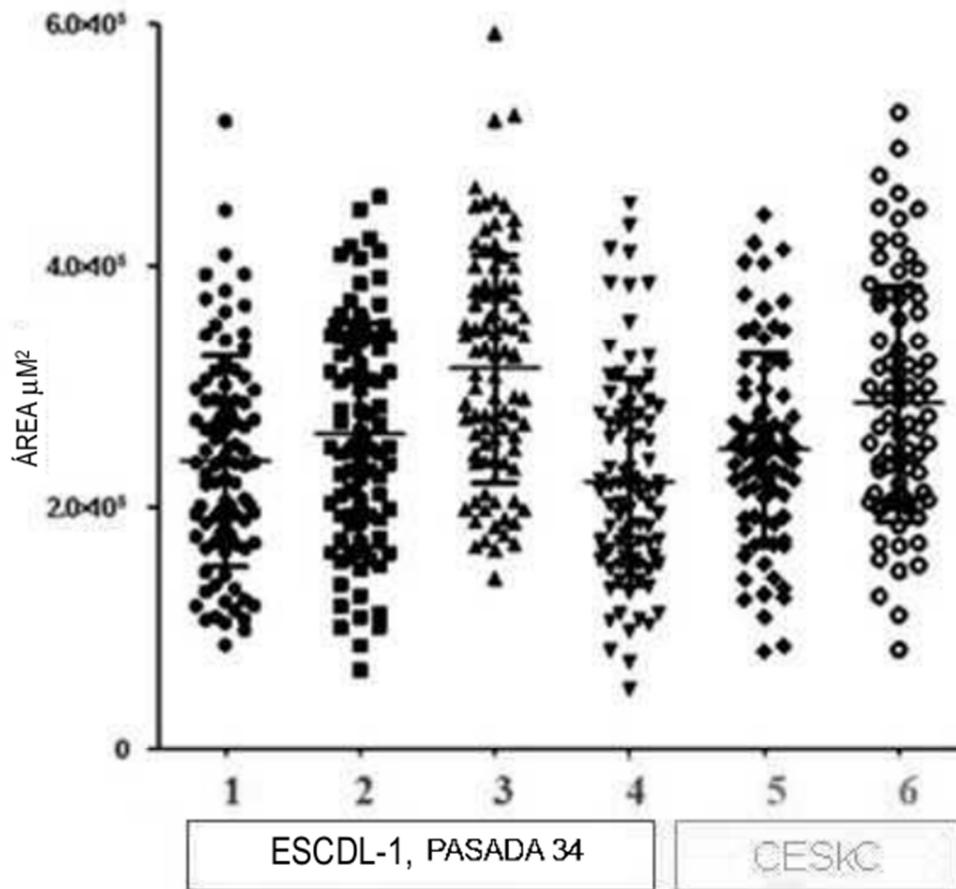


FIGURA 7