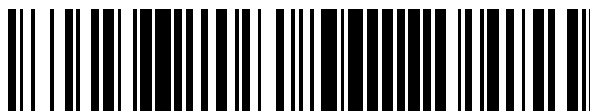


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 827**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/12** (2006.01)

**A61K 39/17** (2006.01)

**A61K 39/285** (2006.01)

**C12N 5/0735** (2010.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/145** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2008 E 12187538 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2572727**

54 Título: **Líneas de embriocitoblastos de pato para la producción de vacunas antivíricas**

30 Prioridad:

**24.04.2007 EP 07300979**

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

**22.06.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 574 827 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Líneas de embriocitoblastos de pato para la producción de vacunas antivíricas

## Descripción de la invención

5 La presente invención se relaciona con el desarrollo y elaboración de vacunas antivíricas. En particular, la invención se relaciona con el campo de la producción industrial de vectores víricos y vacunas, más específicamente con el uso de líneas celulares de pato derivadas de embriocitoblastos que están libres de retrovirus endógenos aviares, para la producción de vectores víricos y virus. La invención es particularmente útil para la producción industrial y vacunas antivíricas para evitar la infección vírica de humanos y animales.

10

## Antecedentes

Las vacunas reducen eficazmente y evitan la muerte y enfermedad causada por muchas infecciones víricas tales como, por ejemplo, gripe, sarampión, paperas, viruela y fiebre amarilla.

15

Muchas vacunas antivíricas se producen actualmente en huevos de pollo embrionados o en fibroblastos de embrión de pollo primario aislados de embriones de pollo. No obstante, la producción de vacunas ocasionalmente se ha visto complicada por contaminación inadvertida con agentes adventicios que se pudieron haber originado de sustratos de células aviares utilizadas para propagar las cepas de vacuna. En realidad, la actividad de transcriptasa inversa (RT), una indicación de la presencia de retrovirus, se detecta en vacunas atenuadas e laboradas con microbios vivos derivados de células de pollo que incluyen las producidas por fabricantes Europeos y de Estados Unidos para fiebre amarilla, sarampión y paperas (Hussain et al., 2003, J. Virol 77: 1105-1111, Johnson et Heneine, 2001, J. Virol., 75:3605-3612). Las investigaciones respecto al origen de la actividad de RT en dichas vacunas encontraron pruebas de partículas que contienen ARN de virus de leucosis aviar endógeno (ALV -E) y virus aviar endógeno (EAV) (Johnson et Heneine, 2001, J. Virol 75:3605-3612; Tsang et al., 1999, J. Virol 73:5843-5851; Weissmahr et al., 1997, J. Virol 71:3005-3012).

20

25

Tanto ALV -E como EAV son miembros de las familias de retrovirus endógenos presentes en la línea germinal de pollo. ALV-E se expresa de los loci ev los cuales son elementos províricos heredables. En base en sus secuencias de envoltura, ALV-E se diferencian de ALV subgrupos A a D y J, los cuales son infecciones adquiridas de manera exógena. Aunque los ALV exógenos provocan varias enfermedades neoclásicas tales como miocarditis y osteoporosis en pollos infectados, no se sabe que ALV-E sea patógeno para pollos. La carencia de un potencial oncogénico en infecciones con ALV-E puede ser atribuida a la ausencia de un oncogén vírico y un mejorador de actividad en la secuencia repetida terminal grande endógena (LTR). Se han identificado más de 20 diferentes loci ev en pollos White Leghorn (ev-1 a ev-22). Las designaciones de los loci ev se asignan en el orden descubierto y son clasificados fenotípicamente con respecto a los productos de gen que expresan y su capacidad para generar partículas infecciosas. Los fenotipos ALV-E conferidos por los loci ev varían de partículas estructurales y enzimáticamente completas infecciosas hasta expresión de proteína vírica detectable defectuosa o nula, estructural o enzimáticamente (RT-). La mayor parte de los loci ev son estructuralmente incompletos y por lo tanto no codifican para todas las secuencias necesarias para la producción de partículas de virus infecciosas. La cepa en pollo, denominada ev-0, se ha obtenido por crianza para ser resistente a ALV -E. Los pollos de la línea-0 carecen de los loci ev (es decir, son ev-0), pero están presentes secuencias províricas de EAV en el genoma de pollos de la línea 0 (Dunwiddie and Faras, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82:5097-5101).

30

35

40

45 Se conoce poco acerca de la familia EAV, la cual es distinta, pero está relacionada con la familia ALV. Los elementos EAV están presentes en por lo menos 50 copias por genoma de pollo. No obstante, ninguna de las secuencias EAV conocidas resultan en genomas retro víricos de longitud completa e intactos y aún no se han identificado aislados de EAV infecciosos. No obstante, se ha demostrado que EAV tiene una expresión elevada en células embrionarias derivadas de aves del género *Gallus*. Weissmahr et al. (Weissmahr et al., 1997, J. Virol 71:3005-3012) han demostrado que las partículas de la familia de retrovirus endógenos EAV son muy responsables, con mayor probabilidad, de una gran porción de la actividad de RT asociado a partículas que se encuentran en los sobrenadantes de fibroblastos de embriones de pollo cultivados.

50

El riesgo de transmisión inadvertida es particularmente elevado para la vacuna antivírica atenuada con organismos vivos dado que no se pueden someter a un procedimiento de inactivación y la mayor parte de los mismos se inyectan al humano, por lo tanto evadiendo los mecanismos de protección inmunitarios inespecíficos. De esta manera, para asegurar la de células para la producción de vacunas a hora de benarse para determinar la presencia de retrovirus capaces de replicarse que puedan pasar a los hospedadores animales o humanos durante la inmunización (WHO, series de reportes técnicos, 1994).

55

60

Por otra parte, los huevos de pollo embrionados y los sistemas de producción de fibroblastos de embrión de pollo primario se asocian con varias limitaciones graves, que incluyen:

- un procedimiento de elaboración largo, molesto y que consume recursos que requiere el suministrar y el control de calidad de grandes cantidades de huevos o fibroblastos de embrión de pollo (CEF) para cada campaña de producción individual;
- la necesidad en muchos casos del uso de embriones de pollo libres de patógenos específicos (SPF) costosos;

65

- los riesgos de un suministro insuficiente de huevos en casos de infecciones epidémicas emparvadas de pollos donadores;
- los costos de inflación relacionados con el uso de sueros bovinos que se obtienen de países libres de encefalopatías espongiforme bovina (BSE);
- 5 - la incapacidad de utilizar huevos para la propagación de virus que son altamente virulentos y mortales para los pollos.

Por lo tanto, existe una necesidad urgente de mejoramiento de las tecnologías de producción de vacunas antivíricas actuales basadas en huevos o fibroblastos embrionarios de pollo. El desarrollo de plataformas de cultivos de células como una alternativa para los sistemas de producción en huevos y CEF para la elaboración de vacunas antivíricas probablemente es la solución más rápida y promisoría para superar los cuellos de botella y limitaciones de tiempo en la producción de vacunas hoy en día. Además, el uso de líneas celulares para la elaboración de vacunas antivíricas en vez de las plataformas de huevo o CEF, tiene las siguientes ventajas adicionales en relación con la seguridad de la vacuna; no hay aditivos antibióticos presentes en la formulación de vacuna; no se necesitan conservadores tóxicos (tal como tiomerasa I); se tienen concentraciones reducidas de endotoxina; no hay problemas respecto a la alergia al huevo; no hay riesgo de un agente adventicio/BSE por cultivo celular en proteína y medio libre de suero; una pureza mayor de la preparación de vacuna antivírica.

Los ejemplos de líneas celulares para la producción de vacunas antivíricas son MDCK (células derivadas de riñón del perro Madin-Darby), PERC6 (células derivadas de células retinales embrionarias humanas modificadas genéticamente al insertar los genes E1 del adenovirus humano tipo 5) desarrollado por CRUCCELL (Países Bajos), células VERO (células derivadas de células epiteliales de riñón de mono verde Africano (*Cercopithecus aethiops*) aislado en Chiba University en Chiba, Japón), BHK21 (células inmortalizadas de células de riñón de cría de hámster). Ninguna de las líneas celulares disponibles satisfacen todos los requerimientos médicos, regulatorios e industriales. Por ejemplo, la mayor parte de estas líneas celulares son tumorigénicas y existen preocupaciones reguladoras importantes respecto al uso de células tumorigénicas para la producción de vacunas humanas; por lo tanto, actualmente las autoridades reguladoras están reacias a aprobar sustratos de células tumorigénicas para la elaboración de vacunas masivas. Además, algunas de estas líneas celulares dependen de anclaje, lo que constituye un problema grave para el incremento en el tamaño de producción industrial de la producción de vacuna.

Así, existe la necesidad de desarrollar líneas celulares independientes de anclaje, libres de replicación competente de retrovirus que sean no tumorigénicas e industrialmente confiables, las cuales sean susceptibles a infección con una amplia gama de virus. Este es el propósito de la presente invención.

Así, el inventor ha aprovechado su conocimiento en biología aviar y embriocitoblastos (ES) aviares para llevar a cabo el desarrollo de líneas celulares de pato estables novedosas que permiten la replicación eficaz de una gran cantidad de vacunas humanas y veterinarias y candidatos de vacunas. Al adoptar un procedimiento registrado (véanse los documentos WO 03/076601 y WO 05/007840), el inventor ha sido capaz de generar una serie de líneas celulares de pato bien caracterizadas y documentadas (es decir, las células dEBx®) que se derivan de células ES de pato, sin etapas de inmortalización genética, química o vírica y que no producen retrovirus competentes de replicación en cultivo.

### Descripción

La presente solicitud proporciona un procedimiento para obtener líneas celulares aviares diploides continuas, denominadas EBx derivadas de embriocitoblastos (ES) aviares, en donde las líneas celulares aviares no producen partículas de retrovirus endógenas capaces de replicarse.

Las líneas celulares de la invención son "continuas" debido a que tienen características para ser cultivadas in vitro con respecto a un periodo de tiempo extendido. Ventajosamente, las células de la invención son capaces de proliferar durante por lo menos 50 generaciones, por lo menos 75 generaciones, por lo menos 100 generaciones, por lo menos 125 generaciones, por lo menos 150 generaciones, por lo menos 175 generaciones, por lo menos 200 generaciones o por lo menos 250 generaciones. Las 250 generaciones no constituyen un límite de tiempo debido a que las células obtenidas aún están vivas y aún pueden ser sometidas a paso para pase adicional. Sin desear unirse a teoría alguna, se postula que las células de la invención se pueden cultivar "continuamente" en la medida en que en las células se exprese telomerasa. En realidad, se supone que el alto nivel de expresión de telomerasa de células aviares de la invención es responsable de la estabilidad genética (es decir, las células aviares de la invención son diploides) y el crecimiento celular continuo.

Mediante el término "pase" se quiere indicar la transferencia o trasplante de células, con o sin dilución, de un recipiente de cultivo a otro. Debe entenderse que en cualquier momento las células se transfieren de un recipiente a otro, y cierta porción de las células se puede perder y por tanto puede presentarse dilución de células, deliberado o no. Este término es sinónimo en término "sub cultivo". El número de pases es el número de veces que las células están en el cultivo, que crecen en suspensión o en adherencia y que han sido subcultivadas o se han pasado a un recipiente nuevo. El término no es sinónimo de duplicación de población o generación de la misma, el cual es el tiempo necesario para que una población celular se duplique una vez; es decir, aproximadamente al momento en que cada una de las células de una población se ha duplicado. Por ejemplo, las células ES aviares de la etapa a) de la invención tienen un tiempo de duplicación de población (PDT) de aproximadamente >40 horas. Las células EBx

aviaries de la invención tienen un PDT de aproximadamente <30 horas; habitualmente para células EBx®, existe un pase cada tres generaciones.

5 Mediante el término "diploide" se quiere indicar que las células de la invención tienen dos copias (2n) de cada cromosoma, habitualmente uno de la madre y uno del padre.

10 El hecho de que las líneas celulares EBx® aviar de la invención sean continuas y diploides (es decir, genéticamente estables) constituye una característica notable y única debido a que estos términos habitualmente son antagonistas. Así, las células cancerosas y/o células inmortalizadas obtenidas por modificación química, física (radiación UV, rayos X o irradiación g, ...) o modificación genética (transformación de virus, sobreexpresión de oncogenes, ...) son células continuas debido a que son capaces de replicarse indefinidamente en el cultivo pero no son genéticamente estables debido a que muestran cariotipos poliploides. Por otra parte, las células primarias tales como fibroblastos embrionarios de pollo, MRC5, WI38, las cuales son células no transformadas, no son continuas debido a que tienen una duración de vida finita después de algunas generaciones, pero son células genéticamente estables (es decir, 15 diploides).

En la presente invención, los términos "líneas celulares" y "células" se utilizan de manera indistinta.

20 Los términos "aviar", "aves" o "de las aves", como se utiliza en la presente, se pretende que tengan el mismo significado y se utilizarán de manera indistinta. El término "aves" se refiere a cualquier especie, subespecie o raza de organismos de la clase taxonómica "ava". En una realización preferida, las "aves" se refiere a cualquier animal del orden taxonómico:

- 25 - "*Anseriformes*" (es decir, pato, ganso, cisne y similares), el orden anseriformes contiene aproximadamente 150 especies de aves en tres familias, los Anhimidae (las chillonas), Anseranatidae (la urraca-ganso) y los Anatidae, los cuales incluyen más de 140 especies de aves acuáticas, entre ellas patos, gansos y cisnes. Todas las especies en el orden están altamente adaptadas para existencia acuática en la superficie del agua. Todas tienen patas palmipedas para nadar eficientemente (aunque algunas posteriormente se han vuelto principalmente terrestres);
- 30 - "*Galliformes*" (es decir, pollos, codornices, pavos, faisanes y similares). Los galliformes es un orden de aves que contienen a los pollos, pavos, codornices y faisanes. Se encuentran en todo el mundo aproximadamente 256 especies.
- "*Columbiformes*" (por ejemplo pichón y similares). Las aves del orden columbiformes incluyen a palomas y pichones ampliamente diseminados.

35 En la presente invención, mediante el término "partícula retroviral endógena" o "partícula de retrovirus endógena" términos que pueden utilizarse de manera indistinta, se quieren indicar una partícula retroviral o un retrovirus codificado y/o que se expresa de las secuencias províricas de ALV-E o EAV presentes en algunos genomas de células aviares. En las aves, se sabe que las secuencias províricas de ALV-E están presentes en el genoma del pollo doméstico (excepto el pollo línea-0), las aves de jungla roja y el faisán de cuello de anillo. En las aves, se sabe que las secuencias províricas de EAV están presentes en todo el género *Gallus* que incluyen pollo doméstico, pollo línea-0, ave acuática de jungla roja, ave acuática de jungla verde, ave acuática de jungla gris, ave acuática de jungla de Ceilán y similares) (véase Resnick et al, 1990, J. Viral., 64:4640-4653).

45 De acuerdo con una realización preferida, el ave de la invención se selecciona de entre las aves que no comprenden secuencias províricas ALV-E y EAV en su genoma y es un pato. Una persona experta en la técnica es capaz de determinar si están presentes las secuencias ALV-E y EAV en el genoma de un ave (Johnson and Heneine, 2001; Weissmahr et al, 1996). Preferiblemente, el ave se selecciona del grupo que consiste de *Anseriformes* (es decir, pato, ganso, cisne), pavos, codornices, codorniz Japonesa, aves de guinea, aves Pea. Por lo tanto las células derivadas de dichas aves no producen partículas ALV-E y/o EAV endógenas capaces de replicarse. Dicho ave se 50 selecciona de entre el grupo que contiene patos, gansos, cisnes, pavos, codornices y codornices Japonesas, aves de Guinea, y aves Pea. De acuerdo con una realización más preferida, el ave es un pato, de manera más preferible patos pequinés y Muscovy. De acuerdo la invención, el ave es un pato pequinés. Por lo tanto, la presente solicitud proporciona un procedimiento para la obtención de líneas celulares de pato diploides continuas derivadas de 55 embriocitoblastos (ES), en donde las líneas celulares de pato no producen partículas retrovirales endógenas capaces de replicarse.

60 Existen otras aves que no comprenden las secuencias províricas ALV-E completas en su genoma pero finalmente secuencias províricas EAV. Una persona experta en la técnica es capaz de determinar si están presentes las secuencias ALV-E y EAV parciales o completas en el genoma de un ave (Johnson and Heneine, 2001). Se han seleccionado varias cepas de pollos por crianza de manera que no contengan las secuencias províricas ALV-E completas (es decir, la cepa ev-0) y por lo tanto no producen retropartículas ALV-E infecciosas, tales como:

- 65 - Pollo doméstico línea 0 del concentrado de aves de corral East Lansing USDA (cepa ELL-0). Los pollos de la línea-0 de East Lansing no contienen ningún loci vírico endógeno (ev) relacionado con ALV (Dunwiddie and Faras, 1985).
- Líneas DE y PE 11 del Institut National de la Recherche Agronomique (Domaine de Magneraud, Surgères, Francia).

Por lo tanto, las células derivadas de aves ev-0 no producen partículas ALV-E endógenas capaces de replicarse. Por lo tanto, la solicitud también describe el ave es un pollo doméstico ev-0 (*Gallus Gallus* subespecies *domesticus*), que preferiblemente se selecciona de entre ELL-0, DE y PE11.

- 5 Habitualmente, los pollos ev-0 aún contienen la secuencia pro vírica de EAV pero hasta ahora no se han identificado aislados EAV infecciosos. Por lo tanto, la presente solicitud describe un procedimiento para obtener líneas celulares de pollo diploides continuas derivadas de embriocitoblastos (ES) de cepas de pollos ev-0, en donde las líneas celulares de pollo ev-0 no producen partículas de retrovirus endógenos capaces de replicarse.
- 10 También hay aves que comprenden secuencias províricas ALV-E y EAV completas y/o incompletas en su genoma pero que no son capaces de producir retropartículas de ALV-E y EAV capaces de replicarse. Una persona experta en la técnica es capaz de determinar si se producen retropartículas infecciosas y/o no infecciosas de ALV-E y/o EAV a partir de células de ave (Johnson and Heneine, 2001; Weissmahr et al., 1996). Preferiblemente, el ave se selecciona del grupo que comprende pollos libres de patógenos específicos (SPF), preferiblemente de la cepa Valo (Lohman) o
- 15 línea 22 (SPAFAS).

Mediante el término "capaces de replicarse" se quiere indicar que las partículas retrovíricas endógenas son infecciosas, es decir, que dichas partículas retrovíricas son capaces de infectar y replicarse en células de pato de la invención.

- 20 El procedimiento de establecimiento de líneas de células aviares diploides continuas, denominado EBx® comprende dos etapas:

- 25 a) aislamiento, cultivo y expansión de embriocitoblastos a partir de aves que no contienen secuencias províricas endógenas completas, o un fragmento de las mismas, susceptibles de producir partículas retrovíricas endógenas capaces de replicarse, de manera más específica secuencias províricas EAV y/o ALV-E o un fragmento de las mismas, en un medio de cultivo completo que contiene todos los factores que permiten su crecimiento y en presencia de una capa alimentadora y complementado con suero animal; opcionalmente en un medio de cultivo completo que puede comprender aditivos tales como aminoácidos adicionales (es decir, glutamina, aminoácidos no esenciales, ...) piruvato de sodio, β-mercaptoetanol, vitaminas, hidrolizado de proteínas de origen no animal (es decir yeastolato, hidrolizados de plantas (soja, trigo, ...);
- 30 b) pase al modificar el medio de cultivo de manera que se obtenga una extracción total de dichos factores, la capa alimentadora y del suero, y opcionalmente los aditivos y además que se obtengan líneas celulares aviares adherentes o en suspensión, denominadas EBx® que no produzcan partículas de retrovirus endógenos capaces de replicarse, células capaces de proliferar durante un período de tiempo prolongado, en un medio basal en ausencia de factores de crecimiento exógenos, capa alimentadora y suero animal.
- 35

En la invención, el ave es un pato.

- 40 La modificación del medio de cultivo de la etapa b) del procedimiento de establecimiento de las líneas celulares EBx®, de manera que se obtenga eliminación progresiva o total de los factores de crecimiento, suero y de la capa alimentadora se puede llevar a cabo simultáneamente, de manera sucesiva o por separado. La secuencia de eliminación de suplementos del medio de cultivo se puede seleccionar de entre:

- 45
- capa alimentadora/suero/factores de crecimiento;
  - capa alimentadora/factores de crecimiento/suero;
  - suero/factores de crecimiento/capa alimentadora;
  - suero/capa alimentadora/factores de crecimiento;
  - factores de crecimiento/suero/capa alimentadora;
- 50
- factores de crecimiento/capa alimentadora/suero.

- 55 En una realización preferida, la secuencia de la eliminación es factores de crecimiento/ capa alimentadora/suero. En una realización preferida, la eliminación de aditivos, tales como piruvato sódico, aminoácidos no esenciales (NNEA), vitaminas, yeastolato se realiza después de la eliminación de la capa alimentadora y antes de la eliminación de suero. Preferentemente, la retirada del yeastolato se realiza después de la retirada del piruvato sódico, NNEA y vitaminas.

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

- 65
- Pato Muscovy (también denominado pato Barbari); etapa VII
  - Ave de Guinea: etapa VII-VIII
  - Pavo: etapa VII-VIII
  - Pato pekinés: etapa VIII

- Pollo: etapa X
- Codorniz Japonesa: etapa XI
- Ganso: etapa XI

5 Preferiblemente, los embriocitoblastos (ES) de pato de la etapa a) se obtienen al disociar embriones de pato pequinés aproximadamente en la etapa VII (oviposición) de la clasificación de Eyal-Giladi. Si el huevo puesto recolectado en la oviposición no se ha desarrollado lo suficiente para recolectar embriocitoblastos, el huevo opuesto puede incubarse adicionalmente entre varias horas (durante la noche) a uno o dos días para que madure el embrión. De acuerdo con una segunda realización, los embriocitoblastos (ES) de pato de la etapa a) es de un pato Muscovy.

10 En el momento de la oviposición, el pato Muscovy no está suficientemente maduro debido a que se encuentra aproximadamente en la etapa VII, y por lo tanto el huevo debe incubarse durante la noche para que madure el huevo hasta la etapa VIII a X de la clasificación de Eyal-Giladi.

15 El método divulgado en el presente documento también puede usarse con embriocitoblastos (ES) de pollo, preferiblemente de la cepa de pollo ev-0, que en la etapa a) se obtienen al disociar embriones aproximadamente en la etapa X (oviposición) de la clasificación de Eyal-Giladi.

20 De manera alternativa, los embriocitoblastos aviares de acuerdo con la etapa a) del proceso divulgado se recolectan de embriones antes de la oviposición. Las limitaciones principales que se encuentran antes de la oviposición es el hecho de que el huevo deba ser extirpado quirúrgicamente de las hembras y que la cantidad de células ES por embrión es menos importante. Además, en etapas muy tempranas del desarrollo del embrión aviar, las células ES no se han individualizado bien haciendo difícil el cultivo *in vitro* de células ES. Una persona experta en la técnica será capaz de definir el intervalo de tiempo antes de la puesta de huevo que permite recolectar células ES aviares.

25 De manera alternativa, los embriocitoblastos aviares de acuerdo con la etapa a) de la invención se pueden recolectar de embriones aviares después de oviposición hasta la eclosión. No obstante, los embriocitoblastos aviares progresivamente entran en diferenciación para generar tejidos diferenciados; por tanto, se prefiere recolectar los ES aviares no demasiado tarde después de que han sido opuestos. Una persona experta en la técnica será capaz de definir el intervalo de tiempo después de que se ha puesto al huevo que permite recolectar embriocitoblastos aviares.

30 De acuerdo con otra realización, las células de la etapa a) son una población de embriocitoblastos enriquecida con células germinales primordiales (PGC). De manera más preferible, las células ES aviares de la etapa a) son PGC purificadas. En especies aviares, las células germinales primordiales surgen de la región central del blastodermo (Ginsburg and Eyal-Giladi, 1987 Development 101(2):209-19; Karagenic et al, 1996 Dev Genet 19(4):290-301; Petite et al. 1997 Poultry Sci. 76(8):1084-92). Después se desplazan a un sitio extraembrionario anterior, la parte creciente germinal hasta que se recolectan por la vasculatura entre 2.5 y 5 días de desarrollo embrionario para llegar al borde germinal. Colonizan el borde germinal en donde finalmente se diferencian en ovocitos o espermatocitos (Nieuwkoop and Sutasurya, 1979. *The Migration of the primordial germ cells. In: Primordial germ cell in Chordates*. London: Cambridge University Press p113-127). Los métodos de aislamiento de PGC de embriones aviares donadores se ha reportado en la literatura y se puede llevar a cabo fácilmente por una persona experta en la técnica (véase, por ejemplo, el documento JP924997 publicado el 7 de septiembre de 1993, publicación números 05-227947; Chang et al. 1992. Cell Biol. Int. 19(2):143-149; Naito et al, 1994. Mol. Reprod. Dev. 39: 153-161; Yasuda et al. 1992. J. Reprod. Fert. 96: 521-528; Chang et al. 1992. Cell Biol. Int. Reporter 16(9):853-857). De acuerdo con una realización, las PGC se recolectan de sangre embrionaria recolectada de la aorta dorsal de un embrión de pollo en la etapa 12-14 de la clasificación de Hamburger & Hamilton (Hamburger & Hamilton. 1951. A series of normal stages in the development of chick embryo. J. Morphol. 88: 49-92). En otra realización preferida, las PGC se recolectan de la parte creciente germinal por disección mecánica de embrión de pollo o de las gónadas. No obstante, como se ha descrito en lo anterior, otros métodos de aislamiento de PGC se conocen y se pueden utilizar de manera alternativa.

50 Estos embriocitoblastos aviares están caracterizados por un tiempo de duplicación lento y que comprende entre 48 y 72 horas en cultivo a 39°C.

55 Sin desear unirse a teoría alguna, las condiciones de cultivo de células definido de células ES aviares seguido por la eliminación de suplementos progresiva en factores de crecimiento, capa alimentadora, aditivos y suero, permite adaptar y seleccionar células que mantienen la mayor parte de la característica deseable de células ES (estabilidad de cariotipo, proliferación indefinida, expresión de marcadores ES), pero además muestran características amigables industrialmente como crecimiento en suspensión hasta densidades celulares elevadas en medio libre de suero. La telomerasa constituye uno de los marcadores ES más importantes. Debido a la expresión sostenida y mantenida de telomerasa durante los pases de células, la célula EBx® es continua (es decir, inmortal) pero además es genéticamente estable (es decir, diploide).

65 De manera más específica, la presente solicitud describe un procedimiento para obtener líneas celulares aviares diploides continuas derivadas de células ES, en donde las líneas celulares aviares no producen partículas retrovíricas endógenas capaces de replicarse, el procedimiento comprende las siguientes etapas de:

- a) aislar embriones de ave, preferiblemente de pato o de pollo ev-0 en una etapa de desarrollo que comprende desde aproximadamente la etapa VI de la clasificación de Eyal-Giladi (clasificación de Eyal-Giladi):

5 EYAL-GILADI and K OCHAN, 1976, "From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development in the chick". "General Morphology" Dev. Biol. 49:321-337) y antes de la eclosión, de manera preferible aproximadamente en la oviposición, en donde el genoma de dicho ave no contiene secuencias províricas endógenas susceptibles de producir partículas retrovíricas endógenas capaces de replicarse;

b) suspender embriocitoblastos (ES) aviares obtenidos por disociación de embriones de la etapa a) en un medio de cultivo basal complementado con:

- 10 - Factor 1 de crecimiento insulínico (IGF -1) y factor neurotrófico ciliar (CNTF);  
 - suero animal; y  
 - opcionalmente, factores de crecimiento que se seleccionan del grupo que consiste de interleucina 6 (IL-6), receptor de interleucina 6 (IL-6R), factor de citoblastos (SCF), y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF);

15 c) sembrar la suspensión de células ES obtenidas en la etapa b) sobre una capa de células alimentadoras y cultivar adicionalmente las células ES durante por lo menos 1 pase;

d) opcionalmente retirar todos los factores de crecimiento que se seleccionan del grupo que comprende IL-6, IL-6R, SCF, FGF del medio de cultivo sobre un intervalo de varios pases de 1 a aproximadamente 15 pases, de manera preferible de 3 a aproximadamente 15 pases y además cultivar las células ES aviares durante por lo menos un pase. Preferiblemente, el retiro de la totalidad de los factores de crecimiento que se seleccionan del grupo que comprende IL-6, IL-6R, SCF, FGF del medio de cultivo se realiza simultáneamente sobre un pase. Habitualmente, el retiro de IL-6, IL-6R, SCF, FGF se realiza aproximadamente en el pase 10 a 15;

20 e) retirada de IGF-1 y CNTF del medio de cultivo y cultivo adicional de las células ES aviares durante por lo menos un pase. Preferiblemente el retiro de los factores de crecimiento que se seleccionan del grupo que comprende IGF-1 y CNTF del medio de cultivo, se realiza simultáneamente, en un pase. Habitualmente, el retiro de IGF-1 y CNTF se realiza a proximadamente en el pase número 15 a número 25. De manera alternativa, el retiro de IGF-1 y CNTF se realiza por disminución progresiva en varios pases (por lo menos 2 pases y aproximadamente hasta 15 pases);

f) progresivamente disminuir la concentración de células alimentadoras en el medio de cultivo de manera que se obtenga un retiro total de la capa alimentadora después de varios pases y cultivar adicionalmente las células;

30 g) de manera opcional, disminuir progresivamente la concentración de aditivos en el medio de cultivo de manera que se obtenga un retiro total de aditivos después de por lo menos un pase; y

h) de manera opcional, disminuir progresivamente la concentración de suero animal en el medio de cultivo de manera que se obtenga un retiro total del suero animal después de varios pases; e

35 i) obtener líneas celulares aviares adherentes denominadas EBx® derivadas de células ES capaces de proliferar en un medio basal en ausencia de factores de crecimiento, capa alimentadora, opcionalmente sin suero animal y aditivos y en donde las líneas celulares aviares diploides continuas no producen partículas retrovíricas endógenas capaces de replicarse;

40 j) de manera opcional, adaptar adicionalmente dichas líneas celulares EBx® aviares adherentes a condiciones de manera de suspensión. La etapa de adaptación de cultivo celular a suspensión se puede llevar a EBx®. Por ejemplo, las células EBx® de pato derivadas de embriocitoblastos Muscovy, las células se adaptan al crecimiento en suspensión antes del retiro de la capa alimentadora. Para células EBx® de pato (EB24, EB26, EB66) derivadas de pato pequinés, las células se adaptan al crecimiento en suspensión antes de retirar el suero animal;

45 k) Opcionalmente sub clonar de manera adicional las células EBx® aviares, por ejemplo por dilución limitada.

Esto hace posible obtener células de pato de acuerdo con la invención.

50 En una realización preferida, la presente solicitud describe un procedimiento para obtener líneas celulares aviares diploides continuas, denominadas EBx®, derivadas de embriocitoblastos (ES) aviares, en donde las líneas celulares aviares no producen partículas retrovíricas endógenas capaces de replicarse, y el procedimiento comprende las etapas de:

a) aislar embriones de ave en una etapa de desarrollo alrededor de la oviposición, en donde el genoma de las aves no contiene secuencias províricas endógenas susceptibles de producir partículas retrovíricas endógenas capaces de replicarse;

55 b) suspender los embriocitoblastos (ES) aviares obtenidos por disociación de embriones de la etapa a) en un medio de cultivo basal complementado con por lo menos:

- Factor 1 de crecimiento insulínico (IGF-I) y factor neurotrófico ciliar (CNTF); y  
 - suero de mamífero tal como suero bovino fetal;

60 c) sembrar la suspensión de células ES obtenidas en la etapa b) sobre una capa de células alimentadoras y cultivar adicionalmente las células ES durante por lo menos un pase;

e) retirar IGF-1 y CNTF del medio de cultivo y cultivo adicional de las células durante por lo menos un pase;

f) disminuir progresivamente la concentración de células alimentadoras en el medio de cultivo de manera que se obtenga un retiro total de la capa alimentadora después de varios pases y cultivar adicionalmente las células;

65 g) disminuir progresivamente la concentración de suero de mamífero en el medio de cultivo de manera que se obtenga un retiro total de suero de mamífero después de varios pases; y

h) obtener líneas celulares EBx® aviares adherentes derivadas de células ES capaces de proliferar en un medio basal en ausencia de factores de crecimiento, capa alimentadora y suero de mamífero y en donde las líneas celulares aviares diploides continuas no producen partículas retrovíricas endógenas capaces de replicarse;

- i) de manera opcional, adaptar adicionalmente las líneas celulares EBx® aviares adherentes a condiciones de cultivo de suspensión, preferiblemente al promover el crecimiento como suspensión, de manera más preferible al transferir líneas celulares EBx® aviares adherentes obtenidas en la etapa h) en otro soporte que tenga una característica de unión menor que el soporte inicial (es decir tal como soporte de unión ultra bajo).

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

10 Este proceso hace posible obtener células de pato de acuerdo con la invención.

En otra realización preferida, el medio de cultivo basado en la etapa b) del procedimiento para obtener líneas celulares aviares diploides continuas se suplementa adicionalmente con un factor de crecimiento que se selecciona del grupo que consiste de interleucina 6 (IL-6), receptor de interleucina 6 (IL-6R), factor de citoblastos (SCF) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), y el procedimiento comprende además una etapa d) de:

- d) opcionalmente retirar todos los factores de crecimiento que se seleccionan del grupo que comprende IL-6, IL-6R, SCF, FGF del medio de cultivo y cultivar adicionalmente células ES durante por lo menos un pase.

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

25 "Medio de cultivo basal" significa un medio de cultivo con una formulación de medio clásica que permite, por sí misma, por lo menos la supervivencia de células, e incluso mejor, el crecimiento de células. Los ejemplos de medios basales son BME (medio de Eagle basal), MEM (medio de Eagle mínimo), medio 199, DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), GMEM (medio de Eagle modificado por Glasgow), DMEM-HamF12, Ham-F12 y Ham-F10, medio de Dulbecco modificado por Iscove, medio MacCoy 5A, RPMI 1640, GTM3. El medio basal comprende sales inorgánicas (por ejemplo:  $\text{CaCl}_2$ , KCl, NaCl,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , ...), aminoácidos, vitaminas (tiamina, riboflavina, ácido fólico, D-Ca pantotenato, ...) y otros componentes tales como glucosa, beta-mercaptoetanol, y piruvato de sodio. Preferiblemente, el medio basal es un medio sintético. La tabla 1 proporciona la composición de DMEM/HAM F12:

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

	<b>Sales Inorgánicas</b>	
	Cloruro de calcio anhidro	116.60
	Nitrato férrico (III) $\cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0.05
	Sulfato férrico (II) $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.417
40	Cloruro de potasio	311.80
	Sulfato cúprico (II) $\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0013
	Cloruro de magnesio $\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	61.20
	Sulfato de magnesio anhidro	48.84
	Cloruro de sodio	6996.00
45	Fosfato diácido de sodio $\cdot \text{H}_2\text{O}$	62.50
	Fosfato diácido disódico anhidro	71.02
	Sulfato de zinc $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.432
	Carbonato ácido de sodio	1200.00
	<b>Aminoácidos</b>	
50	L-alanina	4.45
	L-arginina $\cdot \text{HCl}$	147.5
	L-asparagina $\cdot \text{H}_2\text{O}$	7.50
	Ácido L-aspártico	6.65
	L-cistina $\cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$	31.29
55	L-cisteína $\cdot 2\text{HCl}$	17.56
	Ácido L-glutámico	7.35
	L-glutamina en E15-813	365.00
	Glicina	18.75
	L-histidina $\cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$	31.48
60	L-isoleucina	54.47
	L-leucina	59.05
	L-lisina $\cdot \text{HCl}$	91.25
	L-metionina	17.24
	L-fenilalanina	35.48
65	L-prolina	17.25
	L-serina	26.25
	L-treonina	53.45
	L-triptófano	9.02



	L-tirosina	38.70
	L-valina	52.85
	<b>Vitaminas</b>	
5	D(+)-biotina	0.0035
	D-pantotenato de calcio	2.24
	Cloruro de colina	8.98
	Ácido fólico	2.65
	Myo-inositol	12.60
10	Nicotinamida	2.02
	Piridoxal ·HCl	2.00
	Piridoxina · HCl	0.031
	Riboflavina	0.219
	Tiamina · HCl	2.17
15	Timidina	0.365
	Vitamina B12	0.68
	<b>Otros Componentes</b>	
	D-glucosa anhidra	3151.00
	Hipoxantina	2.10
20	Ácido DL-68-lipoico	0.105
	Ácido linoleico	0.042
	Rojo de fenol	8.10
	Putrescina · 2HCl	0.081
	Piruvato de sodio	55.00

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

- 0.1 a 5 mM de L-glutamina, preferiblemente entre 2 y 3 mM de L-glutamina;
- 0.05 a 2 mM de piruvato de sodio, preferiblemente entre 0.1 mM a 1 mM de piruvato de sodio;
- 0.1 a 2.5% de aminoácidos no esenciales, preferiblemente de aproximadamente 1% de aminoácidos no esenciales;
- 0.1 a 2.5% de vitaminas, preferiblemente aproximadamente 1% de vitaminas;
- 0.05 a 5 mM de β-mercaptoetanol, de manera preferible aproximadamente 0.16 mM de β-mercaptoetanol;
- hidrolizado proteínico de origen no animal.

35 Para el establecimiento de células EBx® de pato de la invención, el medio basal preferiblemente se complementa con hidrolizado proteínico de origen no animal. Los hidrolizados proteínicos de origen no animal se seleccionan del grupo que consiste de triptona de bacterias, triptona de levadura, hidrolizados vegetales tales como hidrolizados de soja o una mezcla de los mismos. En una realización preferida, los hidrolizados de proteína de origen no animal son hidrolizados de levadura. El término "hidrolizado" incluye un digerido enzimático de peptona soja o extracto de

40 levadura. El hidrolizado se puede obtener de una pluralidad de preparaciones de peptona soja o extracto de levadura, respectivamente, las cuales pueden ser digeridas enzimáticamente de manera adicional (por ejemplo por papaína) y/o formadas por autólisis, termólisis y/o plasmólisis. Los hidrolizados también se pueden obtener comercialmente tal como Yeastolato, H y-Soy, H y-Yeast 412 y Hi-Yeast 444, de fuentes tales como SAFC BioSciences (anteriormente JRH) (Lenaxa, KA), Quest International (Norwich, N.Y.), OrganoTechnie S.A. (Francia) o Deutsche Hefewerke GmbH (Alemania). Las fuentes de extractos de levadura también se describen en el documento WO 98/15614. Las fuentes de extractos de levadura e hidrolizados de soja también se describen en el documento WO 00/03000. Los hidrolizados utilizados en los medios de la invención preferiblemente se purifican de una fracción cruda, debido a que las impurezas las cuales pueden interferir con un cultivo eficaz se eliminan preferiblemente durante esta purificación, con lo que se mejora la consistencia del hidrolizado. La purificación puede ser por ultrafiltración en cromatografía Sephadex (por ejemplo, con Sephadex G25 o Sephadex G10 o materiales equivalentes), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión de tamaño o cromatografía en "fase inversa". Preferiblemente, la purificación se realiza por ultrafiltración utilizando un filtro de límite de 10 kDa. Estos procedimientos se conocen en el ámbito. Utilizando estos métodos, se pueden seleccionar fracciones que contengan hidrolizado de soja o de levadura de peso molecular definido. Preferiblemente, el promedio de pesos moleculares de los hidrolizados de soja y levadura preferiblemente se encuentra entre aproximadamente 220 y 375 Da. Preferiblemente, el hidrolizado de levadura está presente en el medio de cultivo celular. El hidrolizado de levadura 50X (aproximadamente 200 g/l) obtenido, por ejemplo de SAFC-BIOSCIENCES (Ref 58902C) está presente en el medio de cultivo celular en una concentración final que comprende entre aproximadamente 0.1X a 2X, de manera preferible aproximadamente 0.5X a aproximadamente 1X en el medio de cultivo. El hidrolizado de soja también se puede agregar al medio de cultivo celular. El hidrolizado de soja 50X obtenido, por ejemplo de SAFC-BIOSCIENCES (Ref 58903C) se agrega en una concentración final que comprende entre aproximadamente 0.1X a 2X, de manera preferible aproximadamente 1X en el medio de cultivo. De manera alternativa, se puede agregar una mezcla de hidrolizado de soja e hidrolizado de levadura al medio de cultivo celular como se describe en el documento US2004/0077086.

65 Un medio basal preferido es DMEM-HamF 12 que se complementa con L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de vitaminas, β-mercaptoetanol 0.16 mM y opcionalmente con hidrolizado de levadura 1X.

Mediante el término "medio de cultivo completo" se quiere indicar un medio de cultivo basal complementado o no, preferiblemente un medio sintético basal complementado con por lo menos un factor de crecimiento y suero animal. Un ejemplo de medios de cultivo completo se describe en los documentos WO 03/076601, WO 05/007840, EP 787180, US 6,114,168, US 5,340,740, US 6,656,479, US 5,830,510 y en Pain *et al* (1996, Development 122:2339-2348). De manera alternativa, el medio de cultivo completo puede ser un medio acondicionado, preferiblemente un medio acondicionado BRL. A modo de ejemplo, el medio acondicionado BRL se prepara de acuerdo con técnicas reconocidas en el ámbito tales como las descritas por Smith y Hooper (1987, Dev. Biol. 121:1-9). Las células BRL están disponibles de ATCC, número de acceso CRL-1442. El medio acondicionado puede ser complementado con factores de crecimiento exógenos y suero animal, como se describe a continuación.

El término "factores de crecimiento", como se utiliza en la presente significa factor de crecimiento necesario para la supervivencia y el crecimiento de células ES aviares no diferenciadas en cultivo en un medio de cultivo basal. Es posible distinguir esquemáticamente dos familias de factores de crecimiento: Las citocinas y los factores tróficos. Las citocinas son principalmente citocinas cuya acción es a través de un receptor el cual se asocia con la proteína gp130. De esta manera el factor inhibidor de leucemia (LIF), la interleucina 11, la interleucina 6, el receptor de interleucina 6, el factor neurotrófico ciliar (CNTF), la oncostatina y cardiotrofina tienen un modo de acción similar con el reclutamiento a nivel de receptor de una cadena específica y la combinación de esta última con la proteína gp130 en forma monomérica o algunas veces heterodimérica. Los factores tróficos son principalmente el factor de citoblastos (SCF), el factor 1 de crecimiento insulínico (IGF-1) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), preferiblemente FGF básico (bFGF) o FGF humano (hFGF).

El medio de cultivo completo comprende medio de cultivo basal, preferiblemente medio sintético basal y por lo menos una citocina cuya acción es a través de un receptor al cual está asociado con la proteína gp130 y/o por lo menos un factor trófico. Preferiblemente, el medio de cultivo completo comprende medio basal y por lo menos un factor de crecimiento que se selecciona del grupo que consiste de factor inhibidor de leucemia (LIF), oncostatina, cardiotrofina, factor 1 de crecimiento insulínico (IGF-1), factor neurotrófico ciliar (CNTF), interleucina 6 (IL-6), receptor de interleucina 6 (IL-6R), factor de citoblastos (SCF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), interleucina 11 (IL-11). De acuerdo con una primera realización preferida, el medio de cultivo completo es medio basal complementado con suero animal y con por lo menos IGF-1 y CNTF. De acuerdo con una segunda realización preferida, el medio de cultivo completo es medio basal complementado con suero animal y por lo menos IGF-1, CNTF, IL-6 e IL-6R. De acuerdo con una tercera realización preferida, el medio de cultivo completo es medio basal complementado con suero animal y por lo menos IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF, FGF. De acuerdo con otra realización, el medio de cultivo completo es un medio de cultivo acondicionado que comprende factores de crecimiento (es decir, expresados por células BRL o STO, por ejemplo) y opcionalmente complementado con por lo menos uno de los factores de crecimiento exógenos que se seleccionan del grupo que consiste de LIF, IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF, FGF, IL-11. La concentración de los factores de crecimiento IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF, FGF, IL-11 en el medio basal o en el medio de cultivo acondicionado está comprendido entre aproximadamente 0.01 y 10 ng/ml, de manera preferible 0.1 a 5 ng/ml y de manera más preferible de aproximadamente 1 ng/ml.

El medio de cultivo también comprende además de antibióticos tales como por ejemplo gentamicina, penicilina y estreptomina para evitar contaminación bacteriana. Los antibióticos se pueden agregar al medio de cultivo en los pasos tempranos de cultivo de células ES. Por ejemplo, se pueden agregar al medio de cultivo gentamicina en una concentración final de 10 ng/ml, penicilina en una concentración final de 100 U/ml y estreptomina en una concentración final de 100 µg/ml. En una realización preferida no se agregan antibióticos al medio de cultivo durante las etapas finales del procedimiento de establecimiento de líneas celulares de pato diploides continuas de la invención.

Durante el procedimiento de establecimiento de células de pato de la invención, las células se cultivan sobre una capa de células alimentadoras. De manera más preferible, las células alimentadoras con células animales o líneas celulares cultivadas con el propósito de cultivar células ES aviares. De manera alternativa, las células alimentadoras se pueden sustituir con matriz extracelular más factores de crecimiento unidos. La matriz alimentadora posteriormente se denominará como células alimentadoras o matriz extracelular. Una matriz alimentadora, como se utiliza en la presente se construye de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Como se indica en lo anterior, se prefiere que la matriz alimentadora esté preacondicionada. Mediante el término "preacondicionada" se quiere indicar que la matriz alimentadora se cultiva en presencia de medio por un período de tiempo antes de la deposición de las células que se originan del disco de blastodermo de huevos aviares fertilizados en contacto con la matriz alimentadora, por ejemplo un tiempo suficiente para iniciar y establecer la producción, por ejemplo de factores de crecimiento u otros factores por la matriz alimentadora; habitualmente, la matriz alimentadora se preacondiciona al cultivar la matriz alimentadora por sí misma durante uno o dos días antes de la deposición de las células que se originan del disco del blastodermo de los huevos aviares fertilizados en contacto con la matriz alimentadora. Preferiblemente, las células alimentadoras comprenden células de fibroblasto de ratón. Se prefieren fibroblastos STO, pero también son adecuados fibroblastos primarios. Además, aunque el presente proceso se ha descrito con respecto al uso de matrices alimentadoras de células de ratón, se contempla que las matrices alimentadoras que comprenden células de otras especies murinas (por ejemplo rata); otras especies de mamífero (por ejemplo especies de ungulados, bovinos o porcinos); o especies aviares (por ejemplo Gallinacea, pollo, pavo, pato, ganso, codorniz, faisán) también pueden ser utilizadas. En otra realización, las células alimentadoras de la invención se pueden transfectar con uno o varios vectores de expresión que permiten, por ejemplo, la expresión constitutiva de factores

de crecimiento tales como SCF aviar en células STO. De esta manera, este "alimentador" produce el factor en una forma la cual es soluble y/o se unen la membrana plasmática de las células. De esta manera, el procedimiento de cultivo de la presente solicitud opcionalmente puede comprender establecer una monocapa de células alimentadoras. Las células alimentadoras se inactivan mitóticamente utilizando técnicas estándar o convencionales.

5 Por ejemplo, las células alimentadoras se pueden exponer a rayos X o radiación gamma (por ejemplo 4000 Rads de radiación gamma) o se pueden tratar con mitomicina C (por ejemplo 10 µg/ml durante 2-3 horas). Los procedimientos para inactivar mitóticamente células también se describen detalladamente en la información enviada típicamente con células desde la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va 20110-2209

10 (por ejemplo las células alimentadoras STO están disponibles bajo ATCC, número de acceso 1503). Opcionalmente, las mono capas se pueden cultivar hasta aproximadamente 80% de confluencia, preferiblemente a aproximadamente 90% de confluencia y de manera más preferible aproximadamente 100% de confluencia. Aunque la configuración de las células alimentadoras como una monocapa es la configuración preferida para el cultivo, se contempla que cualquier configuración adecuada esté dentro del alcance de la presente invención. Así, por ejemplo, las capas, monocapas, conjuntos, agregados u otras asociaciones o dentro del alcance del presente proceso y se contemplan

15 particularmente para que se encuentren dentro del significado del término "matriz".

El medio de cultivo se suplementa con suero animal. El suero animal que se utiliza preferiblemente es suero animal fetal. Se prefiere suero bovino fetal. Además, aunque el presente proceso se ha descrito con respecto al uso de suero bovino fetal, se contempla que también se puede utilizar suero animal que comprende suero de otras especies animales (por ejemplo pollos, caballos, porcinos, ungulados, etc.). La concentración final de suero animal en el medio de cultivo comprende entre aproximadamente 1 y 25%, de manera preferible entre 5% y 20%, de manera más preferible entre 8% y 12%. En la realización preferida, la concentración final de suero animal en el medio de cultivo es de aproximadamente 10%. De acuerdo con una realización preferida, el medio de cultivo comprende

20 aproximadamente 10% de suero bovino fetal.

El ave de la presente invención se selecciona del orden de los Anseriformes y es un pato, de manera más preferible un pato pequinés y de manera mucho más preferible un pato pequinés cepa M14 o G L30. De acuerdo con una segunda realización preferida, el ave de la presente invención es un pato Muscovy. Por lo tanto, la presente invención proporciona un primer procedimiento para obtener líneas celulares de pato diploides continuas derivadas de embriocitoblastos (ES), en donde las líneas celulares de pato no producen partículas retrovíricas en dógenas capaces de replicarse y el procedimiento comprende las etapas de:

30

- a) aislar los embriones de pato en oviposición (es decir, cuando se ponen los huevos) o ligeramente antes o después de la oviposición. Opcionalmente, el huevo se puede incubar, habitualmente durante la noche para que madure (es decir, pato Muscovy);
- 35 b) suspender los embriocitoblastos (ES) de pato obtenidos al disociar embriones de la etapa a) en un medio de cultivo basal complementado con factor 1 de crecimiento insulínico (IGF-1), factor neurotrófico ciliar (CNTF), interleucina 6 (IL-6), receptor de interleucina 6 (IL-6R), factor de citoblastos (SCF) y factor de crecimientos de fibroblastos (FGF) en suero animal;
- 40 c) sembrar la suspensión de células ES obtenidas en la etapa b) sobre una capa de células alimentadoras y cultivar adicionalmente las células ES de pato durante por lo menos 1 pase;
- d) extraer todos los factores de crecimiento que se seleccionan del grupo que comprende IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF, FGF del medio de cultivo sobre un intervalo de 1 a aproximadamente 15 pases, de manera preferible simultáneamente sobre un pase, y cultivar adicionalmente las células ES de pato durante por lo
- 45 menos un pase;
- f) progresivamente disminuir la concentración de células alimentadoras en el medio de cultivo, desde un pase a otro, de manera que se obtenga un retiro total de la capa alimentadora después de varios pases, preferiblemente después de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 pases y cultivar adicionalmente las células;
- 50 g) de manera opcional, disminuir progresivamente la concentración de suero animal en el medio de cultivo de manera que se obtenga un retiro total del suero animal después de varios pases; y
- h) obtener líneas celulares de pato adherentes derivadas de células ES, denominadas EBx® de pato capaces de proliferar en un medio basal en ausencia de factores de crecimiento, una capa alimentadora opcionalmente sin suero animal y en donde las líneas celulares de pato diploides continuas no producen partículas retrovíricas endógenas capaces de replicarse;
- 55 i) de manera opcional, adaptar adicionalmente las líneas celulares de pato adherentes a condiciones de cultivo de suspensión.

Los aditivos para el medio basal se retiran durante el procedimiento y preferiblemente entre las etapas f) y g) o entre las etapas g) y h).

60

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

65

La presente solicitud también proporciona un segundo procedimiento para obtener líneas celulares de pato diploides continuas a partir de embriocitoblastos (ES), en donde las líneas celulares de pato no producen partículas retrovíricas endógenas capaces de replicarse, y el procedimiento comprende las etapas de:

- 5 a) aislar los embriones de pato en oviposición (es decir, cuando se pone el huevo) o ligeramente antes o después de la oviposición. Opcionalmente, el huevo se puede incubar, habitualmente durante la noche para que  
 10 b) suspender los embriocitoblastos (ES) de pato obtenidos al disociar embriones de la etapa a) en un medio de cultivo basal complementado con IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF y FGF en suero animal;  
 c) sembrar la suspensión de células ES obtenidas en la etapa b) sobre una capa de células alimentadoras y cultivar adicionalmente las células ES de pato durante por lo menos 1 pase;  
 15 d) retirar todos los factores de crecimiento seleccionados entre el grupo que comprende IL-6, IL-6R, SCF, FGF del medio de cultivo durante un intervalo de 1 a aproximadamente 15 pases, preferentemente simultáneamente en un pase y adicionalmente cultivar las células ES de pato durante al menos un pase;  
 e) retirar los factores de crecimiento IGF-1 y CNTF del medio de cultivo durante un intervalo de 1 a aproximadamente 15 pases, de manera preferible simultáneamente sobre un pase, y cultivar adicionalmente las células ES de pato durante por lo menos 1 pase;  
 20 f) progresivamente disminuir la concentración de células alimentadoras en el medio de cultivo de manera que se obtenga un retiro total de la capa alimentadora después de varios pases, preferiblemente después de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 pases y cultivar adicionalmente las células;  
 g) de manera opcional, disminuir progresivamente la concentración de suero animal en el medio de cultivo de manera que se obtenga un retiro del suero animal después de varios pases; y  
 25 h) obtener líneas celulares de pato adherentes derivadas de células ES, denominadas EBx® de pato capaces de proliferar en un medio basal en ausencia de factores de crecimiento, capa alimentadora opcionalmente sin suero animal y en donde las líneas celulares aviares diploides continuas no producen partículas retrovíricas endógenas capaces de replicarse;  
 i) de manera opcional, adaptar adicionalmente las líneas celulares de pato EBx® adherentes a condiciones de cultivo de suspensión. Los aditivos para el medio basal se retiran durante el procedimiento y preferiblemente entre las etapas f) y g) o entre las etapas g) y h).

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

La presente solicitud también proporciona un tercer procedimiento para obtener líneas celulares de pato diploides continuas a partir de embriocitoblastos (ES), en donde las líneas celulares de pato no producen partículas retrovíricas endógenas capaces de replicarse, y el procedimiento comprende las etapas de:

- 35 a) aislar los embriones de pato en oviposición (es decir, cuando se pone el huevo) o ligeramente antes o después de la oviposición. Opcionalmente, el huevo se puede incubar, habitualmente durante la noche para que  
 40 b) suspender los embriocitoblastos (ES) de pato obtenidos al disociar embriones de la etapa a) en un medio de cultivo basal complementado con el factor 1 de crecimiento insulínico (IGF-1) y el factor neurotrófico ciliar (CNTF) y suero animal;  
 c) sembrar la suspensión de células ES obtenidas en la etapa b) sobre una capa de células alimentadoras y cultivar adicionalmente las células ES de pato durante por lo menos 1 pase;  
 45 d) retirar los factores de crecimiento IGF-1 y CNTF del medio de cultivo durante un intervalo de 1 a aproximadamente 15 pases, preferentemente simultáneamente en un pase y adicionalmente cultivar las células ES de pato durante al menos un pase;  
 f) progresivamente disminuir la concentración de células alimentadoras en el medio de cultivo de manera que se obtenga un retiro total de la capa alimentadora después de varios pases, preferiblemente después de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 pases y cultivar adicionalmente las células; eliminación de aditivos?  
 50 g) de manera opcional, disminuir progresivamente la concentración de suero animal en el medio de cultivo de manera que se obtenga un retiro del suero animal después de varios pases; y  
 h) obtener líneas celulares de pato adherentes derivadas de células ES, denominadas EBx® de pato capaces de proliferar en un medio basal en ausencia de factores de crecimiento, capa alimentadora opcionalmente sin suero animal y en donde las líneas celulares aviares diploides continuas no producen partículas retrovíricas endógenas capaces de replicarse;  
 55 i) de manera opcional, adaptar adicionalmente las líneas celulares de pato EBx® adherentes a condiciones de cultivo de suspensión.  
 Los aditivos para el medio basal se retiran durante el procedimiento y preferiblemente entre las etapas f) y g) o entre las etapas g) y h).

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

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

Preferiblemente, las líneas celulares de pato EBx® de la invención no muestran actividad de transcriptasa inversa por

análisis Q-PERT. Además no se producen partículas retrovíricas endógenas capaces de replicarse por células de pato EBx®, como se demuestra por los experimentos de co-cultivo de células de pato EBx® de la invención con células capaces de replicarse ALV tales como células QT6 de codorniz o células DF1 de pollo. Además el análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM) también demuestra la ausencia de partículas de retrovirus endógenas capaces de replicarse en células de pato EBx®. Preferiblemente, la línea de células de pato EBx® de la invención se selecciona de entre las líneas de pato EB24, de pato EB26 y de pato EB66, como se describen posteriormente.

La solicitud también describe que el ave se selecciona del orden de Galliformes, y de manera más preferible es un pollo, preferiblemente un pollo doméstico ev-0 (*Gallus gallus* subespecie *domesticus*). Por lo tanto la presente invención describe un procedimiento para obtener líneas celulares de pollo doméstico ev-0 diploides continuas derivadas de embriocitoblastos (ES), en donde las líneas celulares de pollo doméstico ev-0 no producen partículas de retrovirus ALV-E endógeno capaces de replicarse, y el procedimiento comprende las etapas de:

- a) aislar embriones de pollo domésticos ev-0 en oviposición (es decir, en el momento de puesta del huevo) o ligeramente antes o después de la oviposición;
  - b) suspender los embriocitoblastos (ES) de pollo domésticos ev-0 obtenidos por disociación de embriones de la etapa a) en medio de cultivo basal complementado con IGF -1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF y FGF y suero animal;
  - c) sembrar la suspensión de células ES obtenidas en la etapa b) sobre una capa de células alimentadoras y cultivar adicionalmente las células ES de pollo domésticas ev-0 durante por lo menos 1 pase;
  - d) retirar todos los factores de crecimiento que se seleccionan del grupo que comprende IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF, FGF del medio de cultivo sobre una gama de 1 a aproximadamente 15 pases, preferiblemente de manera simultánea sobre un pase y adicionalmente cultivar las células ES de pollo durante por lo menos un pase;
  - f) progresivamente disminuir la concentración de células alimentadoras en el medio de cultivo de manera que se obtenga un retiro total de la capa alimentadora después de varios pases, preferiblemente después de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 pases y cultivar adicionalmente las células;
  - g) de manera opcional, disminuir progresivamente la concentración de suero animal en el medio de cultivo de manera que se obtenga un retiro total de suero animal después de varios pases y;
  - h) obtener líneas celulares de pollo doméstico ev-0 adherentes derivadas de células ES, denominadas EBx ev-0, capaces de proliferar en un medio basal en ausencia de factores de crecimiento, capa alimentadora opcionalmente sin suero animal y en donde las líneas celulares aviares diploides continuas no producen partículas de retrovirus endógeno ALV-E capaces de replicarse;
  - i) opcionalmente, adaptar de manera adicional las líneas celulares aviares EBx ev-0 adherentes a condiciones de cultivo en suspensión.
- Los aditivos al medio basal se retiran durante el procedimiento y de manera preferible entre las etapas f) y g) o entre las etapas g) y h).

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

La presente solicitud también describe un segundo procedimiento para obtener líneas celulares de pollo doméstico ev-0 diploides continuas derivadas de embriocitoblastos (ES), en donde las líneas celulares de pollo doméstico ev-0 no producen partículas de retrovirus ALV-E endógeno capaces de replicarse, y el procedimiento comprende las etapas de:

- a) aislar embriones de pollo domésticos ev-0 en oviposición (es decir, en el momento de poner el huevo) o ligeramente antes o después de la oviposición;
- b) suspender los embriocitoblastos (ES) de pollo domésticos ev-0 obtenidos por disociación de embriones de la etapa a) en un medio de cultivo basal complementado con IGF-I, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF y FGF y suero animal;
- c) sembrar la suspensión de células ES obtenidas en la etapa b) sobre una capa de células alimentadoras y cultivar adicionalmente las células ES de pollo domésticas ev-0 durante por lo menos 1 pase;
- d) retirar todos los factores de crecimiento que se seleccionan del grupo que comprende IL-6, IL-6R, SCF, FGF del medio de cultivo sobre una gama de 1 a aproximadamente 15 pases, preferiblemente de manera simultánea sobre un pase y adicionalmente cultivar las células ES de pollo durante por lo menos un pase;
- e) retirar los factores de crecimiento IGF-1 y CNTF del medio de cultivo durante un intervalo de 1 a aproximadamente 15 pases, preferiblemente de manera simultánea sobre un pase y adicionalmente cultivar las células ES de pollo doméstico ev-0 durante por lo menos un pase;
- f) progresivamente disminuir la concentración de células alimentadoras en el medio de cultivo de manera que se obtenga un retiro total de la capa alimentadora después de varios pases, preferiblemente después de aproximadamente 5 a aproximadamente 45 pases y cultivar adicionalmente las células;
- g) de manera opcional, disminuir progresivamente la concentración de suero animal en el medio de cultivo de manera que se obtenga un retiro total del suero animal después de varios pases; y
- h) obtener líneas celulares de pollo doméstico ev-0 adherentes derivadas de células ES, capaces de proliferar en un medio basal en ausencia de factores de crecimiento, capa alimentadora opcionalmente sin suero animal y en donde las líneas celulares de pollo doméstico ev-0 diploides continuas, llamadas EBx® de pollo no producen partículas retrovíricas endógenas capaces de replicarse;

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

Los aditivos para el medio basal se retiran durante el procedimiento y preferiblemente entre las etapas f) y g) o entre las etapas g) y h).

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

10 La presente solicitud también describe un tercer procedimiento para obtener líneas celulares de pollo doméstico ev-0 diploides continuas derivadas de embriocitoblastos (ES), en donde las líneas celulares de pollo doméstico ev-0 no producen partículas de retrovirus ALV-E endógeno capaces de replicarse, y el procedimiento comprende las etapas de:

- 15 a) aislar embriones de pollo domésticos ev-0 en oviposición (es decir, en el momento de poner el huevo) o ligeramente antes o después de la oviposición;
- b) suspender los embriocitoblastos (ES) de pollo domésticos ev-0 obtenidos por disociación de embriones de la etapa a) en un medio de cultivo basal complementado con IGF-1, y CNTF y suero animal;
- c) sembrar la suspensión de células ES obtenidas en la etapa b) sobre una capa de células alimentadoras y cultivar adicionalmente las células ES de pollo domésticas ev-0 durante por lo menos 1 pase;
- 20 d) retirar todos los factores de crecimiento que se seleccionan del grupo que comprende IGF-1 y CNTF del medio de cultivo sobre una gama de 1 a aproximadamente 15 pases, preferiblemente de manera simultánea sobre un pase y adicionalmente cultivar las células ES de pollo domésticas ev-0 durante por lo menos un pase;
- e) progresivamente disminuir la concentración de células alimentadoras en el medio de cultivo de manera que se obtenga un retiro total de la capa alimentadora después de varios pases, preferiblemente después de aproximadamente 5 a aproximadamente 45 pases y cultivar adicionalmente las células;
- 25 f) de manera opcional, disminuir progresivamente la concentración de suero animal en el medio de cultivo de manera que se obtenga un retiro total del suero animal después de varios pases; y
- g) obtener líneas celulares de pollo doméstico ev-0 adherentes derivadas de células ES, llamadas EBx® ev-0 de pollo capaces de proliferar en un medio basal en ausencia de factores de crecimiento, capa alimentadora opcionalmente sin suero animal y en donde las líneas celulares de pollo doméstico ev-0 diploides continuas no producen partículas retrovíricas endógenas capaces de replicarse;
- 30 h) de manera opcional, a adaptar adicionalmente las líneas celulares de pollo doméstico ev-0 adherentes a condiciones de cultivo en suspensión.

35 Los aditivos para el medio basal se retiran durante el procedimiento y preferiblemente entre las etapas f) y g) o entre las etapas g) y h).

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

La solicitud también describe que el ave es un pollo doméstico (*Gallus Gallus* subespecie *domesticus*) que se obtiene de una parvada libre de patógeno específico (SPF). De manera más preferible, la cepa de pollo es White-Leghorn. Los huevos de pollo SPF se han sometido a análisis sistemático para determinar la ausencia de patógenos bacterianos y virus de pollo conocidos que incluyen el virus de reticuloendoteliosis (REV) y el virus de leucosis exógena aviar (ALV-A, ALV-B, ALV-C, ALV-D, ALV-J). El huevo SPF de la invención pueden ser huevos VALO de LOHMANN (Cuxhaven, Alemania) o huevos L22 de CHARLES RIVER (Spafas). Por lo tanto, la presente solicitud también describe procedimientos para obtener líneas celulares de pollo diploides continuas derivadas de embriocitoblastos (ES) obtenidas de huevos de pollo SPF como las descritas en huevos de pollo ev-0. Preferiblemente, la línea de células EBx® de pollo obtenida de huevos SPF es EBv13.

50 Las líneas celulares EBx® de pollo pueden mostrar actividad de transcriptasa inversa por análisis Q-PERT pero sin producir partículas retrovíricas endógenas capaces de replicación. La ausencia de partículas retrovíricas endógenas capaces de replicarse se puede demostrar por experimentos co-cultivo de células EBx® ev-0 de pollo de la invención con células capaces de replicación de ALV tales como células QT6 de codorniz o células DF1 de pollo. Además, la ausencia de partículas retrovíricas endógenas en células EBx® ev-0 de pollo también se puede demostrar por TEM.

60 La temperatura corporal del ave habitualmente es de aproximadamente 39° C. Por lo tanto, los procedimientos también pueden comprender la etapa adicional de disminuir la temperatura de cultivo celular a 37° C con el fin de adaptar las líneas celulares aviares de la invención para que crezcan a 37° C. Preferiblemente, la adaptación de temperatura se realiza después de la supresión del alimentador y antes de la supresión del suero. De manera alternativa, la adaptación de temperatura se realiza después de la etapa de supresión de suero o después de la etapa de adaptar las líneas celulares a cultivo de suspensión.

65 Las líneas EBx establecidas tienen la característica de crecer y sea como células adherentes o como células en suspensión en un medio de cultivo libre de factores de crecimiento exógenos y suero animal, y sin células alimentadoras. Se pueden utilizar diferentes técnicas solas o combinadas para adaptar las células a cultivo en suspensión, entre estos:

- se siembran células adherentes a una alta densidad celular, ligeramente por encima de la confluencia celular

para obligar a las células a que se encuentren en suspensión;

- se siembran células adherentes en un medio de cultivo celular con una baja concentración de suero animal;
  - se siembran células adherentes sobre recipientes de cultivo celular elaborados de plástico que no permitan la adhesión celular o que produzcan una adhesión celular débil, tales como recipientes bacterianos y placas y
- 5 placas de unión ultrabaja desarrollados por compañías como Corning (recipientes y placas de cultivo de tejido Ref. 3262, 3473, 3471, 3474; matraces referencia 3814 ... ) o Sarstedt (matraz, referencia 831810502 ... );
- se siembran células adherentes sobre el recipiente y se cultivan bajo agitación (aproximadamente 50 rpm).

10 Las células EBx®, preferiblemente EBx® de pato y EBx® ev-0 de pollo se pueden cultivar *in vitro* durante un período de tiempo considerable. Ventajosamente, las células EBx® adherentes o independientes de anclaje (es decir, en "suspensión") obtenidas por el procedimiento de la invención son capaces de proliferar durante por lo menos 50 generaciones, por lo menos 75 generaciones, por lo menos 100 generaciones, por lo menos 125 generaciones, por lo menos 150 generaciones, por lo menos 175 generaciones, por lo menos 200 generaciones, por lo menos 250

15 generaciones. Se entiende que la expresión "línea" significa cualquier población de células capaces de proliferar indefinidamente en cultivo *in vitro* y al mismo tiempo retienen en mayor o menor grado las mismas características morfológicas y fenotípicas. Se pueden obtener clones, por ejemplo, por dilución limitada de células EBx® de la invención. Estos clones son células las cuales son genéticamente idénticas a la célula de la cual se derivan, por división.

20 La presente invención también se relaciona con líneas celulares aviares diploides continuas, denominadas EBx®, que se pueden obtener por el procedimiento de la invención, dichas células EBx® con pequeñas, redondas (es decir, con un diámetro aproximado de 10  $\mu$ m) e individualizadas con un tiempo de duplicación de aproximadamente 30 horas o menos a 37°C o 39°C. Las células EBx® aviares, preferiblemente EBx® de pato o EBx® ev-0 de pollo, expresan un fenotipo de embriocitoblasto con las siguientes características:

- una relación alta núcleo-citoplasma,
  - actividad de telomerasa endógena,
  - opcionalmente, puede no expresar uno o más marcadores ES adicionales tales como fosfatasa alcalina, marcadores SSEA-1, EMA-1 y ENS1.
- 30 - un tiempo de duplicación más corto que el tiempo de duplicación de células ES aviares de la etapa a) del procedimiento de la invención (48 ha 72 ha 39°C) de aproximadamente 30 horas o menos (preferiblemente 24 horas) a 37°C.

Dichas células no producen partículas de retrovirus endógenas capaces de replicarse.

35 Las líneas celulares EBx® de pato de la invención son capaces de proliferar indefinidamente en un medio basal, en particular en un medio tal como el medio SAFC Excell, DMEM, GMEM, DMEM-HamF12 o McCoy, libre de factores de crecimiento endógenos, suero y/o una capa de alimentación inactivada, opcionalmente complementada con varios aditivos usados comúnmente para personas expertas en la técnica. Los ejemplos de aditivos son aminoácidos no esenciales, vitaminas, piruvato de sodio y antibióticos. Las células EBx® de pato de la invención tienen una característica notable para crecer en un medio de cultivo basal que no se complementa con glutamina.

40

La presente solicitud también describe un medio de cultivo celular para mantener embriocitoblastos aviares pluripotentes o multipotentes, preferiblemente embriocitoblastos (ES) de pato pluripotentes o multipotentes en cultivo en un estado no diferenciado. De acuerdo con una realización preferida, la presente solicitud describe un medio de cultivo para embriocitoblastos de pato que comprende un medio de cultivo basal, complementado con suero animal y suplementado con por lo menos IGF-1 y CNTF. De acuerdo con una segunda realización preferida, la presente solicitud describe un medio de cultivo celular para embriocitoblastos de pato que comprende un medio de cultivo basal complementado con suero animal y complementado con por lo menos IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R. De acuerdo con una tercera realización preferida, la presente solicitud describe un medio de cultivo celular para embriocitoblastos de pato que comprende un medio de cultivo basal complementado con suero animal y complementado con por lo menos IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF y FGF. Dichos medios son suficientes para el mantenimiento de células ES de pato en cultivo durante por lo menos 7 días, preferiblemente durante por lo menos 20 días, de manera preferible por lo menos 100 días en un estado no diferenciado. Dicho medio de cultivo de la invención puede comprender además, de manera opcional, por lo menos un compuesto que se selecciona del grupo que comprende interleucina-11, cardiotrofina, oncostatina y factor inhibidor de leucemia (LIF). Preferiblemente, dicho medio de cultivo comprende además hidrolizado de proteína de origen no animal, como se ha descrito previamente, de manera más preferible es hidrolizado de levadura a una concentración 1X. El medio de cultivo de células ES aviares (preferiblemente de pato) de la invención puede comprender además una capa de células alimentadoras.

55

La presente invención por lo tanto proporciona un cultivo de células ES de pato sostenido que consiste esencialmente de células ES de pato no diferenciadas que expresan el fenotipo de citoblastos con las siguientes características:

- una relación alta núcleo-citoplasma,
  - actividad de telomerasa endógena,
  - opcionalmente, las células ES de pato pueden expresar uno o más marcadores ES adicionales tales como los marcadores de fosfatasa alcalina, SSEA-I, EMA-1 y ENS 1,
- 65

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

Dichas células de pato no diferenciadas son capaces de mantener el fenotipo de citoblastos cuando crecen sobre células alimentadoras en un medio de cultivo celular para embriones de pato, como se ha descrito previamente. Dichas células de pato no diferenciadas son útiles para producir patos quiméricos o transgénicos.

Por lo tanto, la solicitud de invención también describe un método para obtener un pato quimérico, el método comprende las etapas de:

- 10 a) introducir un cultivo de células ES de pato sostenido como se describe en lo anterior en la cavidad subgerminal de un embrión de pato receptor; y
- b) incubar el embrión obtenido en la etapa a) para que eclosionen como un pato pequeño;
- c) seleccionar el pato pequeño quimérico que comprende células heterólogas que han colonizado al pato pequeño.

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

- 20 a) introducir células ES de pato modificadas genéticamente como se describe en lo anterior en la cavidad subgerminal de un embrión de pato receptor; y
- b) incubar el embrión obtenido en la etapa a) para que eclosionen como un pato pequeño;
- c) seleccionar el pato pequeño quimérico que comprende células heterólogas modificadas genéticamente que han colonizado al pato pequeño.

La presente solicitud también describe un método para obtener una descendencia del pato pequeño quimérico en donde el método comprende las siguientes etapas:

- a) permitir que el pato pequeño quimérico seleccionado obtenido en la etapa c) madure como un ave adulta;
- 30 b) criar al ave adulta que tiene células heterólogas en el mismo para de esta manera producir descendencia del ave;
- c) seleccionar las aves de interés en la descendencia.

El procedimiento puede comprender la etapa adicional de expresar un polipéptido heterólogo codificado por un vector de expresión comprendido en las células ES de pato modificadas genéticamente. Preferiblemente, el polipéptido heterólogo se suministra en el fluido biológico del pato, tal como suero, espermatozoides, orina o la clara de un huevo aviar en desarrollo producida por una hembra del pato modificado genéticamente.

Las células EBx® de la invención tienen todas las características mencionadas antes y son útiles para la producción de sustancias biológicas tales como vacunas antivirales y péptidos y proteínas recombinantes.

La presente invención también proporciona un procedimiento para replicar un virus en líneas celulares EBx® aviares diploides continuas de la invención. De manera más preferible, la invención proporciona un procedimiento para replicar un virus en líneas celulares EBx® aviares diploides continuas de la invención, preferiblemente líneas celulares EBx® de pato o pollo, que comprende las etapas de:

- infectar un cultivo de células EBx® aviar con un virus de interés; las células EBx® aviares preferiblemente se cultivan en un medio libre de suero animal;
- cultivo de células EBx® aviares infectadas con el fin de replicar el virus;
- cosechar el virus en sobrenadante de cultivo celular y/o dentro de las células.

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

- a) proliferar EBx® aviar en un recipiente de cultivo, en suspensión, en un medio libre de suero No. 1;
- b) infectar las células con el virus seleccionado cuando la densidad celular sea de por lo menos 1.5 millones de células/ml;
- 55 c) opcionalmente, poco antes de la infección, simultáneamente la infección o poco después de la infección, agregar al cultivo celular el medio libre de suero No. 2; y
- d) cultivar adicionalmente las células infectadas con el fin de permitir la replicación del virus; y
- e) opcionalmente, cosechar el virus.

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



El término "virus", como se utiliza en la presente, incluye no sólo los virus que se encuentran de manera natural sino también virus atenuados, virus reagrupados, cepas de vacuna así como virus recombinantes y vectores víricos derivados de los mismos. Los virus de la invención preferiblemente se seleccionan del grupo que comprende los

5 poxvirus, ortomixovirus, paramixovirus, virus de herpes, hepadnavirus, adenovirus, parvovirus, reovirus, circovirus, coronavirus, flavivirus, togavirus, birnavirus y los retrovirus.

En una realización preferida, los virus, los vectores víricos relacionados, las partículas víricas y las vacunas víricas pertenecen, a la familia de poxviridae, y de manera más preferible a cordopoxviridae. En una realización, los virus o

10 los vectores víricos relacionados, las partículas víricas y las vacunas antivíricas son un poxvirus, preferiblemente un avipoxvirus que se selecciona de entre el virus de viruela aviar (es decir TROVAC), el virus canaripox (es decir, ALVAC), el virus juncopox, el virus minahpox, el virus pigeonpox, el virus pittacinepox, el cualipoxvirus, sparrowpoxvirus, el poxvirus starling, y el virus turkeypox. De acuerdo con otra realización preferida, el virus es un virus de variolovacuna que se selecciona de la cepa de virus de variolovacuna Lister-Elstree, virus de variolovacuna modificado tal como el virus de variolovacuna modificado Ankara (MVA), el cual se puede obtener de ATCC (ATCC, No. VR-1508), NYV AC (Tartaglia et al., 1992, Virology, 188:217-232), LC16m8 (Sugimoto et Yamanouchi, 1994, Vaccine, 12:675-681), C VI78 (Kempe et al., 1968, Pediatrics 42: 980-985) y otros virus de variolovacuna recombinantes o no recombinantes.

En otra realización preferida, los virus, los vectores víricos relacionados, las partículas víricas y las vacunas pertenecen a la familia ortho-myxoviridae, en particular el virus de la influenza. El virus de la influenza se selecciona del grupo que consiste de virus de la influenza humana, virus de influenza aviar, virus de influenza equina, virus de influenza porcina y virus de influenza felina. El virus de la influenza preferiblemente se selecciona en las cepas A, B y C. Entre las cepas A uno puede mencionar virus con diferentes subtipos de hemaglutinina y neuraminidasa tales como, sin limitación H1N1, H2N2, H3N2, H4N2, H4N6, H5N1, H5N2, H7N7 y H9N2. Entre las cepas H1N1 se pueden mencionar A/Porto Rico/8/34, A/New Caledonia/20/99, A/Beijing/262/95, A/Johannesburg/1282/96, A/Texas/36/91, A/Singapore, A/Solomon Islands/03/2006. Entre las cepas H3N2, uno puede mencionar A/Panama/2007/99, A/Moscow/10/99, A/Johannesburg/33/94, A/Wisconsin/10/04. Entre las cepas B uno puede mencionar, sin limitación B/Porto Rico/8/34, B/Johannesburg/5/99, B/Viena/1/99, B/Ann Arbor/11/86, B/Memphis/1/93, B/Harbin/7/94, B/Shandong/7/97, B/Hong Kong/330/01, B/Yamanashi/166/98, B/Jiangsu/10/03, B/Malaysia. El virus de influenza de la invención se selecciona de entre virus de tipo silvestre, aislado vírico primario que se obtiene de virus recombinante individual infectado, virus atenuado, virus sensible a la temperatura, virus adaptado a baja temperatura, virus reagrupado, virus manipulado por genética inversa. Cuando el virus de la invención es virus de influenza, el procedimiento del medio de cultivo en condiciones que permiten la propagación del virus. De acuerdo con una realización preferida, la enzima es tripsina. La concentración final de tripsina en el medio de cultivo celular comprende entre aproximadamente 0.01 µg/ml hasta 10 µg/ml. De manera más preferible, la concentración final de tripsina en el medio de cultivo celular está comprendido entre 0.01 y 10 usp/ml (usp: unidad de farmacopea de E. U. A.), preferiblemente de aproximadamente entre 0.05 y 2 usp/ml, y de manera más preferible de aproximadamente entre 0.3 y 1 usp/ml, y de manera mucho más preferible de aproximadamente 0.75 usp/ml.

En otra realización preferida, los virus, los vectores víricos relacionados, las partículas víricas y las vacunas pertenecen a la familia paramyxoviridae. Preferiblemente, el virus es un paramixovirus que se encuentra de manera natural o un paramixovirus recombinante que se selecciona del grupo que comprende el virus de sarampión, el virus de paperas, el virus de rubéola, el virus Sendai, el virus sincicial respiratorio (RSV), los virus de parainfluenza humana tipos I y III, el virus Rinderpest, el virus de malestar canino, el virus de la enfermedad de Newcastle, el virus de para-influenza de patos. De acuerdo con una realización preferida, el virus es un virus de sarampión o un virus de sarampión recombinante. De acuerdo con otra realización preferida, el virus es el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) o un NDV recombinante. Un ejemplo de la cepa NDV es la cepa LaSota. Cuando el virus de la invención es NDV, el procedimiento de la invención comprende preferiblemente la etapa adicional de agregar enzima proteolítica al medio de cultivo en condiciones que permiten la propagación del virus. De acuerdo con una realización preferida, la enzima es tripsina. La concentración final de tripsina en el medio de cultivo celular comprende entre aproximadamente 0.01 µg/ml y 10 µg/ml. De manera más preferible, la concentración final de tripsina en el medio de cultivo celular está comprendido entre 0.01 y 10 usp/ml (usp: unidades de la farmacopea de E.U.A.), de manera preferible de aproximadamente entre 0.3 y 1 usp/ml, de manera más preferible aproximadamente entre 0.4 y 0.75 usp/ml. De manera interesante, las líneas celulares EBx® de la invención que pueden crecer en adherencia son útiles para realizar titulación de virus y preferiblemente titulación de NDV o un análisis en placa. En realidad, a diferencia de los CEF y los fibroblastos DF1 de pollo para los cuales no es posible observar ningún efecto citopático, el crecimiento de virus en células EBx® genera la formación de células gigantes características. Se pueden determinar partículas víricas NDV por análisis de hemaglutinación. Por lo tanto, la invención también describe el uso de células EBx® de la invención para la titulación de virus, tales como el virus NDV.

En otra realización preferida, los virus, vectores víricos relacionados, partículas víricas y vacunas pertenecen a la familia togaviridae. Preferiblemente, el virus es un alfavirus que se encuentra de manera natural o un alfavirus recombinante que se selecciona del grupo que consiste del virus Sinbis, el virus Sernliki forest, el virus O'nyong'nyong, el virus Chikungunya, el virus Mayaro, el virus Ross river, el virus de encefalitis equina oriental, el virus de encefalitis equina occidental y el virus de encefalitis equina venezolana.

En otra realización preferida, los virus, los vectores víricos relacionados, las partículas víricas y las vacunas

pertenecen a la familia herpesviridae. Preferiblemente, el virus es el virus de la enfermedad de Marek que se presenta de manera natural o un virus de enfermedad de Marek recombinante. El virus de la enfermedad Marek (MDV) preferiblemente se selecciona de entre las cepas de vacuna de licencia de MDV tales como: FC 126 (HTV), SB-1, 301B/1, CVI988 Clone C, CVI988/C/R6, CVI988/Rispens, R2/23 (Md11/75).

5 En otra realización preferida, los virus, los vectores víricos, las partículas víricas y las vacunas pertenecen a la familia hepadnaviridae. Preferiblemente, el virus es un hepadnavirus que se presenta de manera natural, el cual se presenta de manera natural o un hepadnavirus recombinante, que preferiblemente se selecciona de entre hepadnavirus aviar y humano. El hepadnavirus aviar preferiblemente se selecciona de entre el grupo que consiste de virus hepatitis B de pato (DHBV), virus de hepatitis B de garza (HHBV) y del ganso de la nieve (SGHBV).

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

15 En otra realización preferida, el virus, los vectores víricos relacionados, las partículas víricas y las vacunas pertenecen a la familia de flaviviridae, en particular el virus del dengue, virus de encefalitis japonesa y virus del nilo occidental.

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

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

25 En otra realización preferida, los virus, vectores víricos relacionados, las partículas víricas y vacunas pertenecen a la familia retroviridae. Preferiblemente, el virus es un retrovirus como se encuentra de manera natural que se selecciona de entre el virus de retículo-endoteliosis, virus de anemia infecciosa de pato, virus de necrosis del bazo de pato o un retrovirus recombinante de los mismos.

30 En otra realización preferida, los virus, vectores víricos relacionados, partículas víricas y vacunas pertenecen a la familia de parvoviridae. Preferiblemente, el virus es un parvovirus como se encuentra de manera natural tal como el parvovirus de pato o un parvovirus recombinante del mismo.

35 En otra realización preferida, los virus, los vectores víricos relacionados, las partículas víricas y las vacunas pertenecen a la familia de adenoviridae. Preferiblemente el virus es un adenovirus como se encuentra de manera natural que preferiblemente se selecciona de entre adenovirus de aves, adenovirus de ganso, adenovirus de pato y adenovirus de pichón o un adenovirus recombinante de los mismos. Los ejemplos de adenovirus de ave son adenovirus de ave 1 (CELO), adenovirus de ave 5 (340), adenovirus de ave 4 (KR95), adenovirus de ave 10 (CFA20), adenovirus de ave 2 (P7-A), adenovirus de ave 3 (75), adenovirus de ave 9 (A2-A), adenovirus de ave 11 (380), adenovirus de ave 6 (CR119), adenovirus de ave 7 (YR36), adenovirus de ave 8a (TR59), adenovirus de ave 8b (764) Y virus de síndrome de caída de huevos. Los ejemplos de adenovirus de ganso son adenovirus de ganso 1, adenovirus de ganso 2, adenovirus de ganso 3. Los ejemplos de adenovirus de pato son adenovirus de pato 2. Los ejemplos de adenovirus de pichón son adenovirus de pichón 1.

45 Los virus recombinantes incluyen pero no se limitan a vectores víricos que comprenden un gen heterólogo. En algunas realizaciones se proporciona una función cooperadora (helper) para replicación de los virus por la célula hospedadora EBx®, un virus cooperador o un plásmido cooperador. Los vectores representativos incluyen pero no se limitan a aquellos que infectarán a células aviares o de mamífero.

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

55 Las células EBx® de la invención también se pueden utilizar para producir proteínas y péptidos recombinantes. La invención también describe un método de producción de proteínas y péptidos recombinantes que incluyen las etapas de: (i) modificar genéticamente las células EBx® de la invención por transfección transitoria o estable de un vector de expresión; (ii) opcionalmente, seleccionar células EBx® que expresen dichas proteínas o péptidos recombinantes; (iii) purificación de los péptidos o proteínas. Los péptidos y proteínas producidos en células EBx® también se incluyen en la presente invención.

60 El recipiente de cultivo se selecciona de manera más preferible de entre un biorreactor de tanque de agitación continua, un biorreactor Wave™, biorreactor Bello™, un mezclador giratorio, un matraz y una fábrica de células. Típicamente, las células se hacen crecer a gran escala a partir de un frasco de banco de células maestro o de trabajo a través de diversos tamaños de matraces T, botellas giratorias o un biorreactor Wave™ y, de manera preferible, finalmente a biorreactores. La suspensión de células resultante de después típicamente se alimenta a un biorreactor de producción de siembra (típicamente con un volumen de 20-30 l) para cultivo adicional y en algunas realizaciones con un biorreactor de producción más grande (típicamente un volumen de 150-180 l y mayor). La relación del volumen del segundo biorreactor (más grande) respecto al biorreactor de siembra depende del grado con el cual se propaga la línea de células en el primer biorreactor, pero típicamente es de 3:1 a 10:1, por ejemplo en

el intervalo de (6-8): l. De acuerdo con una realización preferida, el recipiente de cultivo es un biorreactor de tanque de agitación continua que permite el control de temperatura, aireación, pH y otras condiciones controladas y el cual está equipado con entradas apropiadas para introducir las células, el oxígeno estéril, diversos medios para cultivo y salidas para extraer células y medio así como medios para agitar el medio de cultivo en el biorreactor.

5 De acuerdo con la presente invención, el término "medio libre de suero" (SFM) significa un medio de cultivo celular listo para usarse, es decir, que no requiere la adición de suero animal para permitir la supervivencia de células y el crecimiento celular. Este medio no necesariamente está definido químicamente y puede contener hidrolizados de diversos orígenes por ejemplo de plantas o levaduras. Preferiblemente el SFM es calificado como "origen no animal" es decir, no contiene componentes de origen animal o humano (estado FAO: "libre de origen animal"). En el SFM las proteínas de suero nativas son sustituidas por proteínas recombinantes. De manera alternativa, el medio SFM de acuerdo con la invención no contiene proteína (medio PF: "medio libre de proteínas") y/o está definido químicamente (medio CDM: "medio definido químicamente"). El medio SFM presenta varias ventajas: (i) primero que nada existe un cumplimiento regulador de dicho medio (en realidad no hay riesgo de contaminación por agentes adventivos tales como BSE, o virus); (ii) la optimización de los procedimientos de purificación; (iii) una mejor capacidad de reproducción del procedimiento debido a un medio mejor definido. Los ejemplos de medios SFM disponibles comercialmente son: V P S FM ( InVitrogen R ef 11 681-020, catálogo 2003), O pti P ro ( InVitrogen R ef 12 309-019, catálogo 2003), Episerf (InVitrogen Ref 10732-022, catálogo 2003), Pro 293 S-CDM (Cambrex ref 12765Q, catálogo 2003). LC17 (Cambrex Ref BESP302Q), Pro CRO 5-CDM (Cambrex ref 12-766Q, catálogo 2003), HyQ SFM4CHO (Hyclone R ef S H30515-02), H yQ S FM4CHO-utility ( Hyclone R ef S R30516.02), H yQ P F293 ( Hyclone r ef SH30356.02), RyQ P F Yero (Hyclone Ref SR30352.02), m edio Excell 293 (SAFC Biosciences ref 14570-1000M), Excell 325 P F C HO m edio l ibre d e proteína ( SAFC B ioscience r ef 14 335-1000M), m edio Ex cell VPR O (SA FC Biosciences ref 14560-1000M), medio libre de suero Excell 302 (SAFC Biosciences ref 14312-1000M), Excell 65319, Excell 65421, Excell 65625, Excell 65626, Excell 65627, Excell 65628, Excell 65629 (JRH Biosciences), Excell MDCK SFM (S AFC-Biosciences R ef. 14581 C ), E xcell M DCK P rod ( Ref. M 3678), m edio 3 de gen oterapia ( libre de componente animal) (SIGMA-Aldrich, ref. G-9916 o Excell GTM-3) (a continuación denominado medio G9916), HYQ CDM4 HEK-293 (Hyclone Ref. SH30859), HYQ SFM4 HEK-293 (HYCLONE Ref. SH30521), AEM (InVitrogen). De acuerdo con una primera realización preferida, el medio libre de suero No. 1 y el medio libre de suero No. 2 son el mismo medio. De acuerdo con una segunda realización preferida, el medio libre de suero No. 1 y el medio libre de suero No. 2 tienen una composición diferente.

El procedimiento de la invención abarca la eliminación de la totalidad o un parte del medio 1 libre de suero, seguido por su sustitución por medio libre de suero No. 2. No obstante, es más conveniente quitar una fracción sustancial (por ejemplo de hasta aproximadamente 50%) del medio libre de suero 1 y después reabastecerlo con el medio libre de suero No. 2 mientras aún se está retirando el medio 1, por ejemplo a través de un filtro giratorio. De acuerdo con una realización preferida, el medio libre de suero No. 2 se agrega directamente al medio libre de suero No. 1 sin retirar una parte del medio libre de suero No.1. Se agregan entre 0.25 y 10 volúmenes de medio libre de suero No. 2 a 1 volumen de medio libre de suero No. 1. En una realización preferida, se agregan entre aproximadamente 0.5 y 8 volúmenes de medio libre de suero No. 2 a 1 volumen de medio libre de suero No. 1. En una realización más preferida se agregan entre aproximadamente 3 a 6 volúmenes de medio libre de suero No. 2 a 1 volumen de medio libre de suero No. 1.

El medio libre de suero No. 1 y/o el medio libre de suero No. 2 puede suplementar con por lo menos un ingrediente que se selecciona del grupo que consiste de aminoácidos, lípidos, ácidos grasos, colesterol, vitaminas, carbohidratos, hidrolizados de proteína de origen no animal y una mezcla de los mismos.

De manera alternativa, el procedimiento de replicación de un Virus de la invención es un procedimiento de alimentación por lotes que comprende la etapa adicional de alimentar las células con por lo menos un ingrediente que se selecciona del grupo que consiste de aminoácidos, lípidos, vitaminas, carbohidratos, hidrolizados de proteína de origen no animal, tensioactivos y una mezcla de los mismos. De acuerdo con una primera realización preferida, la alimentación se produce durante las etapas a) a d) del procedimiento de la invención de replicación de un virus, de manera alternativa sólo durante las etapas b) a d), o de manera alternativa sólo durante las etapas d). La alimentación se puede llevar a cabo ya sea en una base diaria o sobre una base continua. Cuando la alimentación es discontinua, la alimentación se puede llevar a cabo una vez al día, más de una vez al día o menos de una vez al día.

El medio SFM de la invención comprende numerosos ingredientes, que incluyen aminoácidos, vitaminas, sales orgánicas e inorgánicas, fuentes de carbohidratos, cada ingrediente está presente en una cantidad la cual soporta el cultivo de una célula *in vitro*. No obstante, con el fin de mejorar el crecimiento de las células o la productividad vírica, se agregan ingredientes adicionales a los medios SFM.

La selección de los aminoácidos que se agregan al cultivo celular se puede determinar por un análisis de consumo de aminoácidos con las células en el cultivo; dicho consumo varía de acuerdo con la especie de célula. De acuerdo con una realización preferida, los aminoácidos agregados al medio se pueden seleccionar del grupo que consiste de asparagine y glutamina o una mezcla de los mismos. En una realización más preferida, se agrega glutamina para cultivo de células EBx de pollo y la alimentación de glutamina se realiza durante la etapa a) a d) para mantener la concentración de glutamina en el medio entre aproximadamente 0.5 mM y aproximadamente 5 mM, de manera preferible entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 3 mM y de manera más preferible en aproximadamente 2 mM. En una realización preferida, la alimentación de glutamina se produce en una base continua. De manera

interesante, la célula EBx® de pato no consume mucha glutamina de modo que las células de pato tienen la capacidad de sintetizar glutamina. Por lo tanto, se puede agregar o no glutamina a un cultivo de células EBx de pato.

De acuerdo con una realización preferida, los carbohidratos agregados al medio se seleccionan del grupo que consiste de D-glucosa, D-sacarosa y D-galactosa o una mezcla de los mismos. De acuerdo con una realización más preferida, el carbohidrato agregado es D-glucosa. La alimentación de D-glucosa se realiza durante la etapa a) a d), de manera más preferible entre b) a d) para mantener la concentración de D-glucosa en el medio entre aproximadamente 0.5 g/l y 25 g/l de D-glucosa, de manera preferible entre aproximadamente 1 g/l y 10 g/l de D-glucosa, de manera preferible de aproximadamente 2 a 3 g/l de D-glucosa. En una realización preferida, la alimentación de D-glucosa se produce en una base continua.

De acuerdo con una realización preferida, los lípidos se seleccionan del grupo que consiste de colesterol, esteroides y ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácidos grasos. De manera más preferible, los ácidos grasos son de SIGMA-ALDRICH (Ref. F7050) y aproximadamente 0.35 µl/ml de solución de ácidos grasos se agrega al medio de cultivo.

El medio puede contener sustancias auxiliares tales como sustancias amortiguadoras como bicarbonato de sodio, estabilizantes de oxidación, estabilizantes para contrarrestar la tensión mecánica o inhibidores de proteasa. Si se requiere se puede agregar un tensioactivo no iónico tal como polipropilenglicol (PLURONIC F-61, PLURONIC F-68, SYNPERONIC F-68, PLURONIC F-71 o PLURONIC F-108) al medio como un agente desespumante. Estos agentes generalmente se utilizan para proteger a las células de los efectos negativos de la aireación puesto que, sin la adición de un tensioactivo, las burbujas de aire ascendentes y que golpean pueden generar daño en aquellas células que se localizan sobre la superficie de estas burbujas de aire ("purgado"). La cantidad de tensioactivo no iónico preferiblemente es tánto re aproximadamente 0.05 y aproximadamente 1.0 g/l, de manera típica entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 5 g/l. De acuerdo con otra realización de la invención, la concentración de tensioactivo en el medio de cultivo celular se puede modificar para adaptar (es decir, aumentar o disminuir) el tamaño de los grumos de células.

De acuerdo con una realización del procedimiento de replicación de un virus de la invención, la adición de medio libre de suero No. 2 al cultivo celular se realiza después de la etapa b) de infección, preferiblemente entre aproximadamente 0.5 a 4 horas después de la etapa b) y de manera más preferible aproximadamente 1 hora después de la etapa b). De acuerdo con otra realización de la invención, la adición de medio libre de suero No. 2 al cultivo celular se realiza antes de la etapa b) de infección, preferiblemente entre aproximadamente 0.5 a 4 horas después de la etapa b) y de manera más preferible aproximadamente 1 hora antes de la etapa b). De acuerdo con otra realización de la invención, la adición de medio libre de suero No. 2 al cultivo celular se realiza simultáneamente a la etapa de infección b). La infección vírica de la etapa b) se lleva a cabo a una m.o.i. (multiplicidad de infección) de aproximadamente  $10^8$  a  $10^{-8}$ , preferiblemente  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ , de manera más preferible aproximadamente  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$  y de manera más preferible aproximadamente  $10^{-4}$ . Una persona experta en la técnica determinará la m.o.i. óptima de acuerdo con el tipo de virus. En la etapa c), las células infectadas preferiblemente se cultivan durante por lo menos 24 h, por lo menos 48 h, por lo menos 72 h, por lo menos 96 h, por lo menos 120 h, por lo menos 144 h. Cuando el virus es un poxvirus, las células infectadas se cultivan por lo menos 144 h.

En el procedimiento de la invención, el cultivo celular de la etapa a) se lleva a cabo por cultivo en lotes, cultivo de lote repetido, cultivo de lote de alimentación o cultivo por perfusión. De manera más preferible, el cultivo celular de la etapa a) se realiza por cultivo de lote de alimentación. La infección de la etapa b) se realiza cuando la densidad celular es de por lo menos aproximadamente 4 millones, de manera preferible 6 millones de células/ml, de manera más preferible 8 millones de células/ml en un procedimiento por lotes o de lotes de alimentación. Cuando se utiliza el procedimiento de perfusión, la infección en la etapa b) se realiza cuando la densidad celular es de por lo menos 8 millones de células/ml, de manera preferible de aproximadamente 9 a 10 millones de células/ml incluso mayor.

El pH del medio de cultivo libre de suero en las etapas a), b), c) y d) preferiblemente se monitorean por el biorreactor. El pH estará en el intervalo de 6.5 a 7.8, de manera preferible aproximadamente de 6.8 a 7.5 y de manera más preferible de aproximadamente 7.2.

En el procedimiento de la invención, la etapa d) dura 1 a 10 días antes de la cosecha. De acuerdo con una realización preferida, la etapa d) dura por 2 a 5 días antes de la cosecha. El tiempo de cosecha (etapa e) se define de acuerdo con la densidad celular en el recipiente de cultivo. El inventor ha encontrado ahora que el tiempo óptimo para cosecha de virus es 2 días después de que la densidad de las células viables ha alcanzado su nivel óptimo y han comenzado a disminuir debido a infección vírica.

El cultivo de célula se realiza a una temperatura que comprende entre 32°C a 39°C, dependiendo del tipo de virus. Para producción de virus de influenza y poxvirus, la infección de cultivo celular preferiblemente se realiza 33°C.

Las células EBx® tienen la capacidad de crecer en cultivo de suspensión con células agrupadas e n agregados sueltos de algunas células, hasta más de cientos de células. Sin desearse unirse a teoría alguna, se considera que el tamaño de los grumos puede variar de acuerdo con la composición del medio de cultivo celular. Por ejemplo, la presencia de un tensioactivo tal como polipropilenglicol (PLURONIC F-61, PLURONIC F-68, SYNPERONIC F-68, PLURONIC F-71 o PLURONIC F-108), la agitación, la concentración de iones divalentes tales como  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$

5 puede tener un efecto sobre el tamaño de los grumos. El inventor ha encontrado que el rendimiento vírico se puede incrementar al permitir que las células EBx® de la invención se agreguen entre sí para formar grumos durante por 10 menos la etapa a) del procedimiento. Durante el aumento de escalas de un lote maestro y un frasco de un banco de células de trabajo a través de los diversos tamaños de matraces T o botellas giratorias a biorreactores, las células de suspensión generalmente se someten a pase a un recipiente más grande, ya sea por dilución en medio fresco o por centrifugación seguido por una resuspensión del sedimento celular en un medio fresco. El inventor ha encontrado que durante los pases de células, se recomienda mantener grumos de células grandes en el cultivo. Para hacer esto, es mejor no romper los grumos de células con el fin de mejorar la replicación del virus en células EBx®. Por ejemplo, durante las fases iniciales de cultivo de la etapa a) en matraces T o botellas giratorias, se recomienda diluir el cultivo celular para el paso de las células a recipientes más grandes y no se recomienda centrifugar ni romper los grumos de células por pipeteo o agitación. No obstante, grumos demasiado grandes pueden ser subóptimos para una elevada producción vírica. En consecuencia, una persona experta en la técnica definirá si una ruptura parcial de los grumos, por pipeteo o agitación durante los pases de células iniciales de la etapa a) puede mejorar el rendimiento vírico. De acuerdo con una realización preferida, los poxvirus, y preferiblemente MVA, ALVAC y virus de viruela aviar se obtienen por un procedimiento de la invención que incluye la etapa a) de proliferar EBx® agrupado en agregados sueltos de doscientas células, por lo menos quinientas células o por lo menos mil células.

20 Los inventores han encontrado que el tamaño de los grumos de células EBx®, preferiblemente los grumos de células EBx® de pato pueden depender de la concentración de iones Mg<sup>2+</sup> y/o Ca<sup>2+</sup> en un medio de cultivo de células independiente de anclaje. Puesto que los grumos demasiado grandes pueden ser subóptimos para una elevada producción vírica, se puede vigilar el tamaño de los grumos al ajustar la concentración de Mg<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> en el medio de cultivo celular.

25 Para células EBx® de pato, el medio de cultivo celular preferiblemente contiene una concentración de Mg<sup>2+</sup> que comprende entre 0.5 mM y 2.5 mM, de manera preferible aproximadamente 1.6 mM y la concentración de Ca<sup>2+</sup> comprende entre 0.01 mM y 0.5 mM, de manera preferible aproximadamente 0.1 mM.

30 La invención también describe el virus que se puede obtener por un procedimiento de la invención. La presente invención también describe una vacuna que contiene el virus de la invención. El procedimiento de elaboración de una vacuna antivírica comprende el procedimiento de replicar un virus de acuerdo con la invención en donde la etapa e) de la cosecha de virus comprende por lo menos una etapa que se selecciona de entre filtrado, concentración, congelamiento y estabilización por adición del agente estabilizante. La cosecha de virus se realiza de acuerdo con tecnologías bien conocidas por una persona experta en la técnica. De acuerdo con una realización preferida, la etapa de cosecha del centrifugación del cultivo celular, después filtrar, concentrar, congelar y estabilizar la preparación de virus por adición de agente estabilizante. Por ejemplo, para virus de influenza véase Furminger e Nicholson, Webster y Hay (Eds) libro de texto de influenza, capítulo 24, pp 324-332.

40 El procedimiento de elaboración de una vacuna vírica de acuerdo con la invención también puede comprender la etapa adicional de inactivación de virus cosechado. La inactivación preferiblemente se realiza por tratamiento con formaldehído, β-propiolactona, éter y éter y detergente (tal como Tween 80<sup>TM</sup>), bromuro de cetil-trimetilamonio (CTAB) y Triton N102, desoxicolato de sodio y fosfato de tri(N-butilo).

45 De acuerdo con otra realización, la invención también describe un procedimiento de preparación de proteínas antigénicas víricas a partir del virus que se pueden obtener por un procedimiento de la invención, el procedimiento comprende las etapas adicionales de:

- 50 a) opcionalmente, incubar el sobrenadante de cultivo celular que comprende el virus completo con una enzima de restricción de ácido desoxirribonucleico, preferiblemente desoxirribonucleasas (DNAsas) (véanse las clasificaciones EC3.1.21 y EC3.1.22) y nucleasas (véanse las clasificaciones EC3.1.30 y EC3.1.31). Preferiblemente, la enzima de digestión de ADN es benzonasa (nucleasa benzon) o desoxirribonucleasa (DNasa) 1;
- b) adición de un detergente catiónico. Los ejemplos de detergente catiónico son: sin limitación: sal de cetil-trimetilamonio tal como CTAB, sal de miristil-trimetilamonio, lipofectina, DOTMA y Tween<sup>TM</sup>;
- 55 c) aislamiento de proteínas antigénicas. Esta última etapa se puede llevar a cabo por centrifugación o ultrafiltración.

60 El virus de la vacuna puede estar presente ya sea como partículas de virus intactas o como partículas de virus desintegradas. De acuerdo con una realización, la vacuna es una vacuna elaborada con organismos muertos o una vacuna inactivada. De acuerdo con otra realización, la vacuna es una vacuna hecha con organismos vivos atenuados, en donde las vacunas comprenden principalmente sobrenadante de cultivo de células EBx que se pueden obtener por el procedimiento de la invención, preferiblemente sin suero, opcionalmente filtrado y/o concentrado y que comprenden al virus. De acuerdo con una tercera realización, la vacuna comprende proteínas antigénicas víricas que se pueden obtener de un virus preparado de acuerdo con el procedimiento de la invención.

65 La solicitud también describe el suministro de una vacuna que comprende una línea de células infectadas EBx®, preferiblemente EBx® de pato o de pollo ev-0, y en donde la línea de células infectadas EBx®, preferiblemente EBx® de pato o de pollo ev-0 se cosechan en la etapa d). La vacuna de la invención puede comprender el virus de la invención en combinación con sustancias

farmacéuticamente aceptables las cuales incrementan la respuesta inmunitaria. Los ejemplos no limitantes de ejemplos de sustancias las cuales incrementan la respuesta inmunitaria comprenden adyuvante incompleto de Freund, saponina, sales de hidróxido de aluminio, lisolectina, polioles Pluronic, polianiones, péptidos, bacilos de Calmette-Ouerin (BCG) y *Corynebacterium parvum*. Los ejemplos de adyuvantes sintéticos es QS-21. Además, las proteínas inmunoestimulantes (interleucinas IL1, IL2, IL 3, IL4, IL 12, IL13, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, ...) se pueden utilizar para incrementar la respuesta inmunitaria a la vacuna.

La vacuna de la invención preferiblemente es una formulación líquida, una preparación congelada, una preparación deshidratada y congelada, adaptada opcionalmente para vía de administración intranasal.

La vacuna de la invención se utiliza para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de un humano o un animal infectado por un virus incluido en la lista previamente. Preferiblemente, la vacuna vírica de la invención de preferencia se utiliza para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de un humano infectado por un virus que se selecciona de entre viruela, influenza, sarampión, papas, virus de rubéola, o RSV. De manera alternativa, la vacuna de la invención preferiblemente se utiliza para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de un animal infectado por un virus que se selecciona de entre influenza, virus de enfermedad de Newcastle, virus de síndrome de caída de huevo, enfermedad bursal infecciosa, virus de bronquitis infecciosa, virus de malestar canino, virus de anemia de pollo. La vacuna vírica recombinante de la invención también se puede utilizar para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de enfermedades crónicas tales como cáncer y enfermedades infecciosas tales como SIDA.

Las líneas celulares EBx® de la invención son útiles para generar y producir virus reagrupados. El virus con un genoma segmentado, tal como el virus de influenza puede ser reagrupado. Cuando se infectan simultáneamente células EBx® de la invención con por lo menos dos cepas diferentes de virus de influenza, está presente en la misma célula hospedadora una mezcla de genoma segmentado de dos cepas diferentes. Durante el ensamblado del virus, todas las combinaciones de segmentos genómicos típicamente se pueden generar. Los virus reagrupados específicos de esta manera se pueden aislar por selección o eliminación con un anticuerpo, por ejemplo, virus con un rasgo deseado (véase Kilbourne E.D. y Plotkin SA y Mortimer E.A. Eds, Bacines 1994). Las líneas celulares EBx® de la invención también son útiles para generar y producir virus de influenza por genética inversa (véase Enami, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:3802-3805 (1990); Enami et Palese, J. Virol. 65:2511-2513 (1991); Luytjes, Cell 59:1107-1113 (1989)).

La presente invención también describe el uso de líneas celulares EBx® de la invención como un sustrato celular para realizar titulación de virus. Las células EBx® son eficaces para sustituir al sistema de células actual, tal como huevos embrionados, los CEF, células DF1 y otras, utilizadas para determinar el título de una solución vírica. Preferiblemente, la titulación vírica se realiza por el método TCID50 (Reed L, Muench H, 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27, 493-97).

La presente invención también describe el uso de líneas celulares EBx® de la invención como un sustrato celular para realizar pruebas sanitarias.

La invención también describe una composición de diagnóstico que contiene los virus de la invención o constituyentes de los mismos.

Los ejemplos siguientes explican la invención con mayor detalle. Los siguientes preparaciones y ejemplos se proporcionan para permitir a una persona experta en la técnica comprender con mayor claridad y llevar a la práctica la presente invención. No obstante, la presente invención no está limitada en alcance por las realizaciones ejemplificadas, las cuales se consideran como ilustraciones de aspectos únicos de la invención únicamente y los métodos los cuales son funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. En realidad, diversas modificaciones de la invención, además de las que se describen aquí, serán evidentes para aquellos expertos en la técnica a partir de la descripción siguiente y los dibujos que la acompañan. Se pretende que dichas modificaciones se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones anexas. Para el resto de la descripción, se hará referencia a la leyenda de las figuras siguientes.

## Figuras

### FIGURA 1: Células EBx de pollo independientes de anclaje.

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

**Figura 1B: Células de EB línea 0 de poBo independientes de anclaje en medio libre de suero.** Las células EB línea 0 se cultivan a 39°C en suspensión de medio libre de suero Excell 66444 (SAFC). Las células EB línea 0 tienen un tamaño homogéneo y crecen en grumos sueltos.

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

Las células EBv13 en el pase p193 expresan un alto nivel de telomerasa del mismo orden de magnitud que las células de pollo EB 14-O74 (véase el documento WO 03/076601) en el pase p 164 (Master cell Bank: MCB) o en

el pase p184 (Workin Cell bank: WCB). Los embriocitoblastos murinos (los mES) se utilizan como un control positivo y fibroblastos de ratón (FED) se utilizan como un control negativo.

**FIGURAS 3A y 3B: Susceptibilidad de Vaio EBv13 de pollo a poxvirus**

Se siembran EBv13 (pase 188) a  $0.4 \times 10^6$  células/ml en 100 ml en matraces F175 ya sea en 40 ml de medio Excell SFM 65319 o medio SFM G9916 (SAFC) complementado con glutamina 4 mM. El crecimiento celular y la infección con MVA-GFP (MOI  $10^{-2}$  TCID<sub>50</sub>/célula) se realiza a 37°C. Una hora después de la infección se agregan 60 ml de medio fresco.

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

Figura 3B: Productividad de MVA expresada en TCID<sub>50</sub>/ml en medio Excell SFM 65319 o medio SFM G9916 (SAFC).

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

El análisis por microscopía electrónica de transmisión de células EBx se realiza por el Dr. A Rivoire (Lyon, Francia). Las células EBx de pato muestran morfología típica de embriocitoblastos (es decir, una relación de núcleo-citoplasma) que recuerda al fenotipo de embriocitoblastos murinos y células VIVALIS EB14 descritas en el documento WO2006/108846. Las células EBx de pato son células redondas pequeñas con un núcleo grande y núcleo, con pseudópodos cortos que se extienden desde la membrana plasmática. Son altamente activas metabólicamente con un citoplasma con ribosomas y mitocondrias.

**FIGURAS 5A y 5B: Expresión de telomerasa en líneas de células EBx de pato**

La expresión de telomerasa durante diferentes etapas del establecimiento de células EBx de pato se investiga mediante la utilización del equipo de detección de telomerasa Roche (Telomerase OCR ELISA).

Figura 5A: Se encuentra telomerasa la cual se expresa en altas concentraciones en diferentes líneas celulares EBx de pato adherentes muy similar a las células EBv13 de pollo. Las células epiteliales de pato utilizadas como un control negativo no expresan telomerasa.

Figura 5B: Durante el procedimiento de establecimiento de suspensión de células EBx de pato, se mantiene un alto nivel de expresión de telomerasa. El alto nivel de telomerasa se investigó en células EBx de pato durante supresión de alimentador (con o sin células alimentadoras) durante el procedimiento de adaptación de las células EB26 de pato a suspensión y después de suspensión de suero de dEB24 y dEB26.

Las células EBx de pato tales como EB24 y EB26 expresan un alto nivel de telomerasa de manera muy similar a las células EB14 de pollo. Las células EB66 de pato también expresan un alto nivel de telomerasa (datos no mostrados).

**FIGURAS 6A y 6B: Las células EBx® de pato no muestran actividad de transcriptasa inversa endógena**

Figura 6A: Se investigó la expresión de transcriptasa inversa endógena por análisis directo F-PERT (Lovatt *et al.*, 1999, J. Virol. Methods, 82: 185-200) en células Clean (FRANCE). Las líneas celulares EBx® de pato, EB26 y EB5-1 no muestran actividad de transcriptasa inversa (RT) endógena. El alto nivel de actividad RT se detectó en cultivo de células EB14 y EBv13 de pollo (a diferentes pases) así como, y en menor grado, en fibroblasto embrionario de pollo (CEF) derivado de una cepa de pollo libre de patógeno específico (SPF). Las células CEM, las cuales son RTasa negativas, se utilizan como un control negativo para establecer el límite de detección del análisis.

Figura 6B: Se investigó la presencia de partículas retrovirales endógenas, ya sea replicantes (es decir, capaces de replicarse), o no replicantes en el sobrenadante de cultivo celular de células EBx de pato y de pollo por medio de un análisis de ELISA que detecta el antígeno P27 de cápside principal de leucocis aviar. Las líneas celulares EBx de pato, EB26 y EB5-1 así como EBv13 de pollo no secretan el antígeno p27 de ALV. En oposición, las células EB14 de pollo expresan el antígeno P27 de ALV.

**FIGURAS 7A Y 7B: Las células EBx de pato no secretan el virus de leucocis aviar replicante (ALV)**

El análisis de cocultivo de células EBx de pato con la línea de células QT6 de codorniz, que se sabe son sensibles a ALV endógeno y exógeno se realizan en Bioreliance (Reino Unido) para detectar la presencia de virus de pato replicante endógeno.

Figura 7A: Describe el principio del cocultivo QT6.

Figura 7B: La presencia del virus replicante se detecta por un análisis de ELISA que detecta el antígeno P27 de cápside principal de leucocis aviar.

El análisis de muestra que ninguna de las células EBx® de pato probadas (dEB26 y dEB51) secretan ALV replicante. El virus RAV-1, el cual se sabe que se replica en QT6, se utilizó como control positivo.

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

Se incubaron células con lectinas marcadas con digoxigenina: La lecitina de aglutinina de Sambuca nigra se une específicamente a Sia2-6Gal, mientras que la lectina de aglutinina de Maackia amurensis se une específicamente a Sia2-3Gal. Las lectinas que se unen a células se manifiestan con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con FITC, de acuerdo con técnicas bien conocidas por las personas expertas en la técnica. Las células marcadas con FITC se numeran con un clasificador de células fluorescente (FACS). Las moléculas SAα2-3 y SAα2-6 se han descrito como receptores de los virus de influenza aviar y humana, respectivamente. Casi todas las células EBx de pato expresan con un alto nivel los receptores de superficie SAα2-3 y SAα2-6.

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

Figura 9A: Se permite que las células EBx® de pato formen grumos pequeños en matraces de tanque de agitación T175 durante la proliferación celular en un medio de crecimiento celular SFM. Los grumos después se infectan con  $10^{-2}$  TCID<sub>50</sub>/célula de virus MVA-GFP y la mezcla se diluye en medio de producción SFM. Durante un período de propagación de virus de 6 días a 37°C, se toman diariamente imágenes de células infectadas expuestas a radiación UV. El pico de la infección por MVA se alcanza en el día 4 post-infección (pi). En el día 6 pi, las células infectadas comienzan a morir.

Figura 9B: titulación del virus MVA-GFP propagada en células EBx® de pato en un biorreactor de alimentación por lotes de 3L (panel izquierdo) se permite que la biomasa derivada de EBx de pato se acumule durante la fase de proliferación celular en un medio de crecimiento Excell (SAFC). En el día 4, la densidad celular alcanza 4 millones de células/ml. Las células después se infectan a  $10^{-1}$  TCID<sub>50</sub>/célula de virus MVA-GFP y la mezcla se diluye en 1.5 l de medio Excell. Durante un período de propagación de virus de 6 días a 37°C las muestras se recolectan diariamente y se realiza la titulación con TCID<sub>50</sub> (panel derecho) al final del ensayo de cinética. Se alcanza un rendimiento de 8.5 unidades logarítmicas de TCID<sub>50</sub>/ml a 4 p.i., lo que corresponde a un rendimiento de 205 TCID<sub>50</sub>/célula.

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

Figura 10A: Las células EBv13 de pollo se cultivan primero en medio SFM a partir de SAFC Biosciences que comprende una alta concentración de calcio (Ca<sup>2+</sup>) (aproximadamente 0.79 mM) y iones magnesio (Mg<sup>2+</sup>); en este medio, las células producen agregados grandes en cultivo.

Tres días después de haber cambiado el medio de cultivo celular con el mismo medio SFM que comprende una concentración menor de Ca<sup>2+</sup> (0.03 mM final) y Mg<sup>2+</sup> (1.6 mM final) las células forman agregados más pequeños.

Figura 10B: Las células de pato EB24, EB26 y EB66 se cultivan primero en el medio SFM a partir de SAFC Biosciences que comprende una alta concentración de iones calcio (Ca<sup>2+</sup>) (aproximadamente 0.79 mM) y magnesio (Mg<sup>2+</sup>); en este medio, las células producen agregados grandes en cultivo.

Tres días después de haber cambiado el medio de cultivo celular con el mismo medio SFM que comprende una concentración menor de Ca<sup>2+</sup> (0.03 mM final) y Mg<sup>2+</sup> (1.6 mM final), las células forman agregados más pequeños.

**FIGURAS 11A y 11B: Producción de cepas A de virus de influenza en células EBx de pato en biorreactores de 31**

Se permite que la biomasa de EBx® de pato se acumule a 37°C durante la fase de proliferación celular en un medio de crecimiento celular. Las líneas después se infectan a  $10^{-4}$  TCID<sub>50</sub>/célula de virus de influenza A/HY1N1/Beijing/262/95 O A/H3N2/New York/55/2004, la mezcla se diluye en 1.5 l de medio de producción Excell complementado con 0.75 USP/ml de tripsina y se disminuye la temperatura a 33°C. Durante un período de propagación de virus de 14 días se recolectan muestras diariamente y se almacenan a -80°C.

Figura 11A: Cinética de crecimiento de células EBx de pato infectadas con la cepa de virus de influenza A/H1N1/Beijing/262/95. Panel izquierdo: Densidad celular (rombos,  $\times 10^6$  células.ml<sup>-1</sup>) y título vírico en unidades logarítmicas de TCID<sub>50</sub>/ml.

Panel derecho: número total de células (cuadros), viabilidad (círculos negros, %) y concentración de hemaglutinina, en  $\mu\text{g/ml}$  (círculos rojos, %)

El rendimiento vírico alcanza 20  $\mu\text{g}$  de hemaglutinina por ml de sobrenadante de cultivo.

Figura 11B: Cinética de crecimiento de células EBx de pato infectadas con cepa de virus de influenza A/H3N2/New York/55/2004

Panel izquierdo: Densidad celular (rombos,  $\times 10^6$  células.ml<sup>-1</sup>)

Panel derecho: Número total de células (cuadros), viabilidad (círculos negros, %) y concentración de hemaglutinina, en  $\mu\text{g/ml}$  (círculos rojos, %).

El rendimiento vírico alcanza 30  $\mu\text{g}$  de hemaglutinina por ml de sobrenadante de cultivo.

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

Se permite que la biomasa de EBx® de pato se acumule a 37°C durante la fase de proliferación celular en un medio de crecimiento celular. Las células después se infectan con  $10^{-3}$  TCID<sub>50</sub>/célula de virus de influenza B/Jiangsu/1012003, la mezcla se diluye en 1.5 l de medio de producción Excell complementado con 0.75 USP/ml de tripsina y se hace descender la temperatura a 33°C. Durante un período de propagación de virus de 14 días se recolectan las muestras diariamente y se almacenan a -80°C.

Panel izquierdo: Densidad celular (rombos,  $\times 10^6$  células.ml<sup>-1</sup>)

Panel derecho: Número total de células (cuadros), viabilidad (círculos negros, %) y concentración de hemaglutinina, en  $\mu\text{g/ml}$  (círculos rojos, %)

El rendimiento vírico alcanzó 25  $\mu\text{g}$  de hemaglutinina por ml de sobrenadante de cultivo.

**FIGURA 13: Análisis de productividad de NDV y expresión de proteína vírica en suspensión de células EBV66 de pato (MOI  $10^{-3}$ , 0.75 USP/ml de tripsina)**

Las células EBx de pato y pollo son sensibles y replican NDV, cepa La Sota. Los títulos (en TCID<sub>50</sub>/ml) de NDV producidas por células EB66 de pato aumentan del día 0 al día 2 pi para alcanzar un promedio de  $10^{6.83}$  TCID<sub>50</sub>/ml (figura 13, panel izquierdo).

El análisis de transferencia Western (figura 13, panel derecho) muestra las proteínas víricas NDV (HN, Fo/F, NP y M) de expresión. La composición de proteínas víricas de virus NDV producidas en células EB66 de pato son similares a las que se obtienen con virus NDV producidas en células EB14 de pollo. Además, la cinética de liberación para virus producidos en células EBx de pollo y pato son similares.

**FIGURA 14: Análisis de replicación de virus de sarampión recombinante en suspensión de células EB66 de pato (MOI  $10^{-1}$  o  $10^{-2}$ ) en matraces de cultivo de tejido en medio libre de suero.** Las células EB66 de pato son por lo menos tan sensibles como las células VERO a 5 infección por virus de sarampión. Los títulos (en TCID<sub>50</sub>/ml) del virus de papeas recombinante que expresa proteína fluorescente verde (GFP) producida en células EB66 de pato alcanza  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml al día 6 postinfección.

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

Se investigó la expresión de telomerasa en diferentes pasajes de EB66 de pato cultivada en botellas giratorias mediante la utilización del equipo de detección de telomerasa de Roche (Telomerase OCR ELISA). Se investigó



por análisis FACS SSEA-1 y EMA-1 en diferentes pases de EB66 de pato cultivado en botellas giratorias.

Figura 15A: Se encontró que la telomerasa se expresa en una alta proporción en una suspensión de una línea de células EB66 de pato en diferentes pases (138,144,147,150,154).

Figura 15B: Se encontró que los marcadores de superficie celular SSEA-1 y EMA-1 se expresan con un alto nivel en una suspensión de líneas celulares EB66 de pato en diferentes pases (138, 144, 147, 150, 154).

#### **FIGURA 16: Análisis de cariotipo de células EB66 de pato**

El cariotipo de células EB66 de pato se realizó por Pr. Franck, ENVL, Lyon. Las células EB66 son células diploides.

## **Ejemplos**

### **EJEMPLO 1: Línea de células EBv13 de pollo a partir de pollo SPF, cepa VALO**

#### **1.1 -Materia prima**

##### **Huevos**

La cepa libre de patógenos específicos (SPF) se denomina Valo. La cepa Valo es una cepa Leghorn blanca producida y suministrada por Lohmann de Alemania. Los huevos de pollo SPF suministrados con un certificado de análisis, se analizan para determinar: CAV, adenovirus aviar (grupo 1, serotipos 1-12 y grupo 3), EDS, virus de encefalomielitis aviar, virus de leucocis aviar/RSV (que incluye serotipo ALV-J), virus de nefritis aviar, reovirus aviar, virus de viruela aviar, virus de bronquitis infecciosa, virus de bursitis infecciosa (IBDV), virus de laringotraqueitis infecciosa, influenza virus tipo A, virus de enfermedad de Marek, micoplasmosis (Mg + Ms), micobacterium avium, virus de enfermedad de Newcastle, virus de retículo endoteliosis, Salmonella pullorum, otras infecciones por salmonella, virus de rinotraqueitis aviar (ART), Hemophilus paragallinarum. Los huevos de pollo Valo se envían únicamente a una desinfección con el descontaminante para evitar cualquier riesgo de contaminación relacionado con la manipulación de los huevos durante el transporte.

##### **Células alimentadoras**

En la primera etapa del procedimiento del establecimiento de EBv13, se utilizan células de origen murino (células STO), como la capa alimentadora para mantener la pluripotencia de citoblastos de pollo. Estas células alimentadoras están inactivadas mitóticamente por irradiación (45 a 55 Grays) antes de su siembra en plástico. Esta dosis de irradiación es una dosis submortal que induce una supresión definitiva del ciclo celular pero que aún permite la producción de factores de crecimiento y matriz extracelular, necesarios para la promoción del crecimiento celular de células no diferenciadas.

La línea de células STO se deriva de A. Bernstein, Ontario Cancer Institute, Toronto, Canadá de una línea continua de fibroblastos embrionarios de ratón SIM (ratones endogámicos Sandos) y se suministra por la American Type Culture Collection (ATCC) (STO, número de producto: CRL-1503, número de lote 1198713). Se preparan dos veces a la semana capas alimentadoras frescas, en general el lunes y jueves. Las células exponenciales se disocian y se cuentan. Una parte de las células se siembra para mantenimiento de cultivos viables y otra parte se irradia. Para irradiación, se prepara una suspensión celular a  $10 \times 10^6$  células/ml en tubos. Las células se exponen a una dosis de 45 a 55 greys y se siembran en plástico.-Después de la siembra, los recipientes o las placas se recubren con células alimentadoras inactivadas y se utilizan durante un máximo de 5 días.

##### **Medio**

DMEM - HamF12 (Cambrex, Cat No. BE04-687) medio Optipro (Invitrogen n.º de catálogo 12309)  
EX-CELL<sup>MR</sup> 65195,60947 y 65319 (SAFC, medio adaptado)

##### **Aditivos**

Glutamina (Cambrex, n.º de catálogo BE17-605E)  
Penicilina/estreptomina (Cambrex, Cat No. BE17-602E)  
Aminoácidos no esenciales (Cambrex, n.º de catálogo BE13-114E)  
Piruvato de sodio (Cambrex, n.º de catálogo BE13-115)  
Vitaminas (Cambrex, n.º de catálogo 13-607C)  
Beta-mercaptoetanol (Sigma, n.º de catálogo M7522)

##### **Amortiguador y fijadores**

PBS 1X (Cambrex, n.º de catálogo BE17-516F)  
Paraformaldehído 4% (Sigma, n.º de catálogo P6148)  
KCl 5.6% (Sigma, n.º de catálogo P9333)  
Metanol/ácido acético (3/1): Metanol (Merck, n.º de catálogo K34497209; Ácido acético Sigma n.º de catálogo A6283)  
Colcemida, Karyomax (Gibco, n.º de catálogo 15212-046)

**Agente crioprotector**

Sulfóxido de dimetilo (DMSO) (Sigma, n.º de catálogo D2650)

5 **Factores**

Se utilizan dos factores recombinantes diferentes:

- 10  Factor neurotrófico ciliar humano recombinante (CNTF) (Peprotech Inc, n.º de catálogo 450-13)
- Factor I similar a insulina humano recombinante (IGF1) (Peprotech Inc, n.º de catálogo 100-11)

15 Los dos factores se producen en bacterias *E. coli*.

**Suero bovino fetal**

*Suero bovino fetal no irradiado (FBS) (JRH, n.º de catálogo 12103)*

20 El suero no irradiado utilizado en el programa se recolecta y produce en los Estados Unidos. Los animales utilizados para recolección son inspeccionados por USDA y aceptables para matanza. Se ha agregado en el medio durante cultivo de citoblastos aviares. Este lote no se envía a irradiación para evitar la destrucción de proteínas críticas o componentes identificados como esenciales para el mantenimiento de los citoblastos en cultivo.

25 *Medio irradiado (JRH, n.º de catálogo 12107)*

30 El lote irradiado utilizado en este programa también se recolecta en los Estados Unidos. Este lote irradiado se agrega como suplemento en el medio DMEM utilizado para el cultivo de células STO o FED (células alimentadoras). Estas no requieren como citoblastos una calidad específica de suero para crecimiento y mantenimiento de cultivo. Para minimizar la alta concentración en suero en el medio hemos adaptado las células STO para que crezcan en presencia de 4% de FBS únicamente.

**Agentes disociantes**

35 • *Pronase (Roche, n.º de catálogo 165 921)*

Pronase es una proteasa recombinante fabricada por Roche Diagnostics, Alemania, utilizada para la disociación de citoblastos aviares adherentes.

40 • *Tripsina EDTA (Cambrex, n.º de catálogo BE17-161E)*

45 La tripsina se utiliza para la disociación de células STO o FED y en pases tardíos para la disociación de células aviares adaptadas a medio libre de suero. Esta enzima de origen porcino es fabricada asépticamente de acuerdo con las condiciones de referencia cGMP por un método de filtración estéril validado y probable de acuerdo con E.P. actual. La materia prima, irradiada antes de la formulación se analiza para determinar parvo virus porcino en cumplimiento estricto con 9/CFR 113.53.

• *Solución de disociación celular no enzimática (Sigma, n.º de catálogo C5914)*

50 Este agente de disociación es una formulación lista para usarse que se utiliza para separar suavemente células de la superficie de crecimiento del recipiente de cultivo. La fórmula no contiene proteínas y permite la disociación en las células sin el uso de enzimas. Las proteínas celulares se conservan lo que posibilita estudios inmunológicos que dependen del reconocimiento de proteínas de la superficie celular. Esta enzima se utilizó para separar células antes de análisis por FACS de marcadores biológicos como EMA-1 (antígeno 1 de membrana epitelial) y SSEA-1 (antígeno 55 1 embrionario específico de etapa).

**1.2 PROCEDIMIENTO PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LINEA CELULAR EBV13**

60 Los huevos se abren, se separa la yema de la albúmina durante la abertura. Los embriones se separan de la yema ya sea directamente con la ayuda de una pipeta Pasteur o con la ayuda de un papel filtro absorbente pequeño (papel Whatmann 3M), se cortan de antemano en forma de un anillo perforado con la ayuda de un punzón. El diámetro de la perforación es de aproximadamente 5 mm. Estos anillos pequeños se esterilizan utilizando calor seco durante aproximadamente 30 minutos en un horno. Este anillo de papel pequeño se deposita sobre la superficie de la yema y se centra sobre el embrión el cual de esta manera es rodeado por el anillo de papel. Este último después se recorta con la ayuda de pares pequeños de tijeras y la totalidad separada se coloca en una caja de Petri, se rellena con PBS 65 o con solución salina fisiológica. El embrión separado de esta manera por el anillo se limpia del exceso de yema en el medio y el disco embrionario de esta manera libre del exceso de vitelina se recolecta con una pipeta Pasteur.

Los embriones Valo de pollo se colocan en un tubo que contiene medio fisiológico (PBS 1X, Tris Glucosa, medio y similares). Los embriones Valo después se disocian mecánicamente y se inoculan en una capa de células STO alimentadoras en medio de cultivo completo a 39° C. Las células alimentadoras se siembran en matraz a aproximadamente  $2.7 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. El medio de cultivo completo está constituido de medio comercial basal DMEM-HamF12 complementado con suero bovino fetal 10%, con IGF-1 y CNTF a una concentración final de 1 ng/ml y con 1% de aminoácidos no esenciales, con 1% de mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 1 mM, con β-mercapto-etanol a una concentración final de 0.2 mM, glutamina en una concentración final de 2.9 mM, con una mezcla inicial de antibióticos que contienen penicilina a una concentración final de 100 U/ml y estreptomycin a una concentración final de 100 µg/ml. Rápidamente después de los primeros pases de las células, las mezclas de antibióticos ya no se agregan al medio. La expresión "rápidamente" se entiende que significa después de los primeros 3 a 5 pases en general.

Cuando las células ES aviares de embriones Valo de pollo se someten a pase de un recipiente de cultivo a otro, la siembra en el medio de cultivo completo. Preferiblemente, la siembra se realiza con aproximadamente entre  $7 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> a  $8 \times 10^4$  cm<sup>2</sup> de células ES aviares en el medio de cultivo completo. Preferiblemente, la siembra se realiza con aproximadamente  $7.3 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> ( $4 \times 10^6$  células/55 cm<sup>2</sup> o  $4 \times 10^6$  células/recipiente de 100 mm). Las células aviares, preferiblemente células embrionarias aviares de la etapa A) se cultivan durante varios pases en el medio completo. En el pase 15, el medio completo se suprime de factores de crecimiento IGF-1 y CNTF. La supresión se realiza directamente en una etapa, de un pase a otro. Los embriocitoblastos, preferiblemente los citoblastos aviares se cultivan durante varios pases en el medio completo sin los factores de crecimiento IGF-1 y CNTF.

Después, la supresión de células alimentadoras se realiza después de la supresión de factores de crecimiento IGF-1 y CNTF por una disminución progresiva de la concentración de células alimentadoras durante varios pases. Prácticamente, la misma concentración de células alimentadoras se utiliza durante 2 a 4 pases, después se utiliza una concentración menor de células alimentadoras durante 2 a 4 pases adicionales y así sucesivamente. El matraz originalmente se siembra con aproximadamente  $2.7 \times 10^4$  células alimentadoras/cm<sup>2</sup>, después aproximadamente  $2.2 \times 10^4$  células alimentadoras/cm<sup>2</sup>, después aproximadamente  $1.8 \times 10^4$  células alimentadoras/cm<sup>2</sup>, después aproximadamente  $1.4 \times 10^4$  células alimentadoras/cm<sup>2</sup>, después aproximadamente  $1.1 \times 10^4$  células alimentadoras/cm<sup>2</sup>, después aproximadamente  $0.9 \times 10^4$  células alimentadoras/cm<sup>2</sup>, después aproximadamente  $0.5 \times 10^4$  células alimentadoras/cm<sup>2</sup>. Después, el matraz se siembra con  $6.5 \times 10^4$  células aviares/cm<sup>2</sup> a  $7.5 \times 10^4$  células aviares/cm<sup>2</sup> y sin células alimentadoras. La supresión de células alimentadoras comienza a aproximadamente en el pase 21 y termina aproximadamente en el pase 65. Durante la supresión de células alimentadoras, las células ES Valo de pollo se siembran en matraces de cultivo a una concentración menor que en la etapa a), aproximadamente de alrededor de  $4 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> a  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. En la hipótesis de que las células ES Valo no están en buena forma después de una disminución de la concentración de células alimentadoras en el matraz, entonces las células aviares se cultivan para pases adicionales con la misma concentración de células alimentadoras antes de proseguir la supresión de células alimentadoras.

La supresión de suero se realiza después de supresión del factor de crecimiento y de las células alimentadoras. Al inicio de la supresión de suero, el medio de cultivo está constituido de medio comercial basal DMEM-HamF12 complementado con suero bovino fetal 10% y con aminoácidos no esenciales 1%, con 1% de una mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 1 mM, con β-mercaptoetanol a una concentración final de 0.2 mM, glutamina en una concentración final de 2.9 mM. Las células Valo de pollo se adapta al crecimiento en un medio de cultivo libre de suero en un procedimiento de dos etapas: en primer lugar, las células Valo de pollo se adaptan rápidamente a un medio de cultivo constituido de medio libre de suero comercial (SFM), preferiblemente, ExCell 60947 (SAFC Biosciences) complementado con suero bovino fetal 10% y con aminoácidos no esenciales 1%, con 1% de mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 1 mM, con β-mercaptoetanol a una concentración final de 0.2 mM, glutamina en una concentración final de 2.9 mM. Una vez que se realiza esta adaptación rápida a un medio nuevo (DMEM-HamF12 a ExCell 60947) se realiza, se inicia una segunda etapa que consiste de una adaptación lenta a una concentración cada vez menor de suero animal en el medio SFM. La supresión de suero se realiza por una disminución progresiva comenzando desde 10% de suero, después 7.5%, posteriormente 5%, después 2.5%, después 1.25%, posteriormente 0.75% de concentración de suero en medio de cultivo celular SFM hasta finalmente alcanzar 0% de suero en medio de cultivo celular SFM. La supresión de suero comienza en el pase 103 y finaliza en el pase 135.

Al final del procedimiento de eliminación de suministro de suero cuando la concentración remanente de suero en el medio SFM es de 0.75% o 0%, la adaptación de células EBv13 dependientes de anclaje para el cultivo de suspensión se inicia. Entre los varios intentos realizados para aislar aislados EBv13 independientes de anclaje, 62.5% de los intentos tuvieron éxito y permitieron obtener diferentes aislados de suspensión de células EBv13. Se seleccionó un aislado de células EBv13 de acuerdo con el tiempo de duplicación de población (aproximadamente 18 h), la concentración celular óptima en el cultivo de matraz (aproximadamente 4 millones de células/ml), la viabilidad celular, la homogeneidad de cultivo celular (presencia y tamaño de grupos de células) y la facilidad de manipular las células (figura 1).

Al final de la supresión de suero, las células Valo de pollo dependientes de anclaje, denominadas EBv13 son capaces de crecer en ausencia de factores de crecimiento y la ausencia de células alimentadoras, en medio libre de suero. Las células EBv13 después se adaptan al crecimiento a 37°C al disminuir progresivamente la temperatura de

cultivo celular a 0.5°C/día.

## **EJEMPLO 2: Línea de células EB de pollo, línea 0 de cepa de pollos SPF ELL-0**

### 5 **2.1 -MATERIAS PRIMAS**

#### **Huevos:**

10 Se proporcionan pollos de cepa libre de patógeno específico (SPF) denominada ELL-0 (línea Lansing oriental 0) por el Avian Disease and Oncology Laboratory (VSDA-ARS-MWA, EUA). Estos huevos de pollo SPF se producen de una parvada analizada intensamente e n b úsqueda d e diversos p atógenos p ara aves de corral. L as enf ermedades probadas incluyen: *Salmonella pul lorum*, *S almonella gallinarum*, *mycoplasma gallisepticum mycoplasma synoviae*, virus de L eucosis aviar A-D y J , virus de enf ermedad de Marek, virus d e r eticuloendoteliosis, adenovirus aviar, bronquitis infecciosa, enfermedad bursal infecciosa, influenza aviar, enfermedad de Newcastle, encefalomielitis aviar  
15 y reovirus aviar. Los huevos de pollo de línea 0 se envían únicamente a desinfección con el descontaminante para evitar cualquier riesgo de contaminación relacionado con la manipulación de los huevos durante el transporte.

#### **Células alimentadoras**

20 En la primera etapa del procedimiento de establecimiento de EB línea 0, se utilizan células de origen murino (células STO) c omo una c apa alimentadora p ara mantener l a pl uripotencia d e c itoblastos de pollo. E stas c élulas alimentadoras se inactivan mitóticamente por irradiación y (45 a 55 Grays) antes de su siembra en plástico. Esta dosis de irradiación es una dosis submortal que induce una supresión definitiva del ciclo celular pero que aún permite la producción de factores de crecimiento y matriz extracelular, necesarios para la promoción del crecimiento celular  
25 de células no diferenciadas.

La línea de células STO se deriva de A. Bernstein, Ontario Cancer Institute, Toronto, Canadá de una línea continua de fibroblastos embrionarios de ratón SIM (ratones endogámicos S andos) y s e s uministra por la American T ype Culture Collection (ATCC) (STO, número de producto: CRL-1503, número de lote 1198713). Se preparan capas de  
30 alimentador fresco dos veces a l a semana. Las células exponenciales se disocian y se cuentan. Una parte de l as células se siembra para mantenimiento de cultivos viables y otra parte se irradia. Para irradiación, preparamos una suspensión celular a  $10 \times 10^6$  células/ml en tubos. Las células se exponen a una dosis de 45 a 55 grey y se siembran en plástico. Después de la siembra, los recipientes en placas de cubiertos con células alimentadoras inactivadas se utilizan durante un máximo de 5 días.

35

#### **Medios**

DMEM -HamF12 (Cambrex, Cat No. BE04-687)  
medio GTM-3 (Sigma, n.º de catálogo G9916)  
40 medio EX-CELL<sup>MR</sup> 66522, 65788 y 66444 (SAFC, medio adaptado)

#### **Aditivos**

Glutamina (Cambrex, n.º de catálogo BE17-605E)  
45 Penicilina/estreptomina (Cambrex, Cat No. BE17-602E)  
Aminoácidos no esenciales (Ambrex, n.º de catálogo BE13-114E)  
Piruvato de sodio (Cambrex, n.º de catálogo BE13-115)  
Vitaminas (Cambrex, n.º de catálogo 13-607C)  
Beta-mercaptoetanol (Sigma, n.º de catálogo M7522)  
50 Yeastolate (SAFC, n.º de catálogo 58902C)

#### **Amortiguadores y fijadores**

PBS 1X (Cambrex, n.º de catálogo BE17-516F)  
55

#### **Agente crioprotector**

Sulfóxido de dimetilo (DMSO) (Sigma, n.º de catálogo D2650)

#### 60 **Factores**

Se utilizan seis factores recombinantes diferentes:

- 65  Factor neurotrófico ciliar humano recombinante (CNTF) (Peprotech Inc, n.º de catálogo 450-13)  
 Factor 1 similar a insulina humano recombinante (IGF-I) (Peprotech Inc, n.º de catálogo 100-11)  
 Interleucinas-6-humanas recombinantes (IL-6) (Peprotech Inc, n.º de catálogo 200-06)  
 Receptor de interleucina 6 soluble humanas recombinante (sIL6r) (Peprotech Inc, n.º de catálogo 200-06)

R)

Factor de citoblastos humanos recombinantes (SCF) (Peprotech Inc, n.º de catálogo 300-07)

Factor de crecimiento de fibroblastos básicos humanos recombinantes (bFGF) (Peprotech Inc, n.º de catálogo 100-18B)

5 Todos los factores, excepto IL6r, se producen en bacterias *E. coli* IL6r soluble se expresa en células HEK293 transfectadas.

### 10 **Suero bovino fetal**

*Suero bovino fetal no irradiado (FBS) (SAFC, n.º de catálogo 12003)*

15 El suero no irradiado utilizado en el programa se recolecta y produce en Australia. Los animales utilizados para recolección se inspeccionaron por USDA y son aceptables para matanza. Se agrega en el medio durante el cultivo de citoblastos aviares. Este lote no se envía a irradiación para evitar la destrucción de proteínas críticas o componentes identificados como esenciales para el mantenimiento de citoblastos en cultivo.

*Suero irradiado (JRH, n.º de catálogo 12007)*

20 El lote irradiado utilizado en este programa se recolecta en Australia. Este lote irradiado se agrega como suplemento en el medio DMEM utilizado para el cultivo de células STO o FED (células alimentadoras). Aquellas células que no requieren como citoblastos una cantidad específica de suero para crecimiento y mantenimiento en cultivo. Para minimizar la alta concentración de suero en el medio se adaptaron las células STO para que crecieran en presencia de 4% de FBS únicamente.

### 25 **Agentes disociantes**

•Trypzean (Sigma, n.º de catálogo T3449)

## 30 **2.2 – PROCEDIMIENTO DE ESTABLECIMIENTO DE LA LINEA DE CELULAS LINEA 0**

Los embriones de 13 huevos de pollos de línea 0 se recolectaron de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.2. Después, los embriones de línea 0 se colocaron en un tubo que contiene PBS 1X. Los embriones después se disociaron mecánicamente y se inocularon sobre una capa de células STO alimentadoras en medio de cultivo completo a 39°C. Las células alimentaron se sembraron en recipientes a aproximadamente  $2.7 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. El medio de cultivo completo está constituido de medio comercial basal DMEM-HamF12 complementado con suero bovino fetal 10% con IGF1, CNTF, bFGF, IL-6, IL-6r y SCF a una concentración final de 1 ng/ml y con 1% de aminoácidos no esenciales, con 1 % de una mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 1 mM, con  $\beta$ -mercaptoetanol a una concentración final de 0.2 mM, glutamina a una concentración final de 2.9 mM con yeastolate 1X y con una mezcla inicial de antibióticos que contienen penicilina a una concentración final de 100 U/ml y estreptomycin a una concentración final de 100 µg/ml. Después de 7 pases, la mezcla de antibióticos ya no se agrega al medio.

45 Cuando las células ES aviares de embriones de pollo línea 0 se transfieren de un recipiente de cultivo a otro, la siembra de los recipientes de cultivo se realiza con aproximadamente entre  $7 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> a  $8 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> de células ES aviares en medio de cultivo completo. Preferiblemente, la siembra se realiza a aproximadamente  $7.3 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> ( $4 \times 10^6$  células/55 cm<sup>2</sup> o  $4 \times 10^6$  células/recipiente de 100 mm). Las células aviares, preferiblemente células embrionarias aviares de la etapa a) se cultivan durante varios pases en medio completo complementado con 10 ó 15% de FBS. En el pase 7, el medio completo se suprime de factores de crecimiento bFGF, IL-6, IL-6r y SCF. Dicha supresión se realiza directamente en una etapa, de un pase a otro. Los embriocitoblastos, preferiblemente las células embrionarias aviares se cultivan durante varios pases en medio completo sin estos 4 factores de crecimiento. En el pase 12, los dos últimos factores, IGF-1 y CNTF, se retiran del medio y las células se amplifican sin factor.

55 Para promover el crecimiento celular se utilizan sucesivamente 3 medios base: DMEM-HamF12 del pase 1 al pase 18, Excell GTM-3 del pase 18 al pase 26 y una mezcla de Excell 66788 y Excell 66522 después del pase 26.

60 Después del pase 30, la supresión de células alimentadoras se realiza por una disminución progresiva de la concentración de células alimentadoras durante varios pases siguiendo un procedimiento etapa por etapa descrito previamente. Durante esta fase de supresión de alimentador, algunas capaces de crecer en suspensión se aíslan utilizando Excell 66444 como medio de crecimiento y se inicia la supresión de suero (figura 1B).

### **EJEMPLO 3: Células EBx de pato, línea EB66**

#### **3.1 -MATERIA PRIMA**

#### 65 **Huevos de pato**

Los huevos de pato pequinés cepas GL30 se obtienen de GRIMAUD FRERES SELECCION (La Corbiere, Roussay Francia). Los patos de origen se vacunaron contra *Escherichia coli* (vacuna autógena Coli 01 y 02), *Pasteurella multocida* (Landavax), hepatitis vírica de pato (Hepatovax), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Ruvax), metapneumovirus aviar (Nemovac), *Salmonella typhimurium* y *Enteridis* (vacuna autógena), *Riemerella antipestifer* (Autovaccine Riemerella), metapneumovirus aviar (Nobilis R TV in activo) y *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Ruvax). Después de la recepción, los huevos de pato pequinés fertilizados se envían a desinfección en un baño de hipocloruro por una descontaminación con Fermacidal (Thermo) para evitar cualquier riesgo de contaminación relacionado con polvo unido al cascarón.

#### 10 **Células alimentadoras**

En la primera etapa del procedimiento, las células de origen murino (células STO) se utilizan como capa alimentadora para mantener la pluripotencia de citoblasto de pato. Las células alimentadoras se inactivan mitóticamente por irradiación (45 a 55 greys) antes de sembrar en plástico. Esta dosis de irradiación es una dosis sub mortal que induce supresión definitiva del ciclo celular pero que aún permite la producción de factores de crecimiento y matriz extracelular, necesarios para la promoción y el crecimiento celular de células no diferenciadas. La línea de células STO derivada por A. Bernstein, Ontario Cancer Institute, Toronto, Canadá de una línea continua de fibroblastos embrionarios de ratón SIM (ratones endogámicos Sandos) y se suministra por la American Type Culture Collection (ATCC) (STO, número de producto: CRL-1503, número de lote 1198713). Las capas alimentadoras frescas se preparan dos veces a la semana, las células en fase exponencial se disocian y se cuentan. Una parte de las células se siembra para mantenimiento de cultivos viables y otra parte se irradia. Para irradiación, se prepara una suspensión celular a  $10 \times 10^6$  células/ml en tubos. Las células se exponen a una dosis de 45 a 55 greys y se siembran en plástico. Después de la siembra, los recipientes o las placas se recubren con células alimentadoras inactivadas y se utilizan durante un máximo de 5 días.

25

#### *Medio*

EX-CELL<sup>MR</sup> 65788, 65319, 63066 Y 66444 (SAFC, medio adaptado)  
 medio GTM-3 (Sigma, n.º de catálogo G9916)  
 DMEM-HamF12 (Cambrex, Cat No. BE04-687)  
 DMEM (Cambrex, n.º de catálogo BE 12-614F)

30

#### *Aditivos*

Glutamina (Cambrex, n.º de catálogo BE17-605E)  
 Penicilina/estreptomicina (Cambrex, Cat No. BE17-602)  
 Aminoácidos no esenciales (Ambrex, n.º de catálogo BE13-114E)  
 Piruvato de sodio (Cambrex, n.º de catálogo BE13-115)  
 Vitaminas (Cambrex, n.º de catálogo 13-607C)  
 Beta-mercaptoetanol (Sigma, n.º de catálogo M7522)  
 Yeastolate (SAFC, n.º de catálogo 58902C)

35

40

#### *Amortiguador y fijadores*

PBS 1X (Cambrex, n.º de catálogo BE17-516F)

45

#### *Agente crioprotector*

Sulfóxido de dimetilo (DMSO) (Sigma, n.º de catálogo D2650)

50

#### *Factores*

Se utilizan dos factores recombinantes diferentes:

55

- Factor neurotrófico ciliar humano recombinante (CNTF) (Peprotech Inc, n.º de catálogo 450-13)
- Factor I similar a insulina humano recombinante (IGF 1) (Peprotech Inc, n.º de catálogo 100-11)

Estos 2 factores se producen en bacterias *E. coli*.

60

#### *Suero bovino fetal*

*Suero bovino fetal no irradiado (FBS) (SAFC, n.º de catálogo 12003)*

65

El suero no irradiado utilizado en el programa se recolecta y produce en Australia. Los animales utilizados para recolección se inspeccionaron por USDA y son aceptables para matanza. Se agrega en el medio durante el cultivo de citoblastos aviares. Este lote no se envía a irradiación para evitar la destrucción de proteínas críticas o componentes identificados como esenciales para el mantenimiento de citoblastos en cultivo.

*Suero irradiado (JRH, n.º de catálogo 12107)*

5 El lote irradiado utilizado en este programa se recolecta en Australia. Este lote irradiado se agrega como suplemento en el medio DMEM utilizado para el cultivo de células STO (células alimentadoras). A aquellas células que no requieren como citoblastos una calidad específica de suero para crecimiento y mantenimiento en cultivo. Para minimizar la alta concentración de suero en el medio se adaptaron las células STO para que crecieran en presencia de 4% de FBS únicamente.

10 *Agentes disociantes:*

- *Pronase (Roche, n.º de catálogo 165 921)*

15 Pronase es una proteasa recombinante fabricada por Roche Diagnostics, Alemania, utilizada para la disociación de citoblastos aviares adherentes.

- *Tripsina EDTA (Cambrex, catálogo No. BE17-161 E)*

20 Se utiliza tripsina para la disociación de células STO y en pases tardíos para la disociación de células aviares adaptadas a medio libre de suero. Esta enzima de origen porcino es fabricada asépticamente de acuerdo con condiciones de referencia cGMP por un método de filtración estéril validado y se prueban de acuerdo con E.P. actual. La materia prima, irradiada antes de la formulación, se prueba para parvovirus porcino en cumplimiento estricto con 9/CFR 113.53.

- *Trypzean (Sigma, n.º de catálogo T3449)*

30 La solución de Trypzean se formula con tripsina bovina recombinante, expresada en maíz y fabricada por Sigma Aldrich utilizando un sistema de expresión de proteína vegetal transgénica registrada ProdiGene. Este producto se optimiza para la disociación celular tanto en cultivos de célula adherentes libre de suero como complementado con suero.

- *Solución de disociación celular no enzimática (Sigma, n.º de catálogo C5914)*

35 Este agente de disociación es una formulación lista para utilizarse que se usa para separar suavemente células de la superficie de crecimiento en el recipiente de cultivo. La fórmula no contiene proteínas y permite la disociación de las células sin el uso de enzimas. Las proteínas celulares se preservan posibilitando estudios inmunoquímicos que dependen del reconocimiento de las proteínas de superficie celular. Esta enzima se utiliza para separar células antes de análisis FACS de marcadores biológicos como EMA-1 (antígeno 1 de membrana epitelial) y SSEA-1 (antígeno 1 embrionario específico de etapa).

40 **3.2 -PROCEDIMIENTO PARA EL ESTABLECIMIENTO DE CELULAS EBx DE PATO LINEA EB66**

45 Aproximadamente 360 huevos de pato fertilizados se abren, se separa la yema de la albúmina durante la abertura. Se extraen los embriones de la yema con la ayuda de papel filtro absorbente pequeño (papel Whatmann 3M), se recortan de antemano en forma de un anillo perforado con ayuda de un punzón. El diámetro de perforación es de aproximadamente 5 mm. Estos anillos pequeños se esterilizan utilizando calor seco aproximadamente 30 minutos en el horno. En la práctica, durante la etapa de recolección de embriones, se deposita un anillo de papel pequeño sobre la superficie de la yema y se centra sobre el embrión el cual de esta manera está rodeado por un anillo de papel. Este último después se recorta con la ayuda de un par pequeño de tijeras y la totalidad se extrae y se coloca en una caja de Petri, llenada con PBS. De esta manera el embrión es transportado por el anillo en donde se limpia el exceso de yema en el medio y el disco embrionario, de esta manera libre de exceso de vitelina se recolecta con una pipeta Pasteur.

55 Los embriones de pato se colocan en tubos de 50 ml que contienen PBS 1X. Los embriones de pato se disocian mecánicamente de esta manera, se lavan con PBS y se siembran en una cámara inactivada de células STO alimentadoras en medio de cultivo completo a 39°C, CO<sub>2</sub> 7.5%. Las células alimentadoras se siembran en placas de 6 pozos o en recipientes de aproximadamente 2.7 x 10<sup>4</sup> cm<sup>2</sup>. El medio de cultivo completo está constituido de DMEM-HamF12 de medio libre de suero complementado con suero bovino fetal 10%, con IGF 1, CNTF, a una concentración final de 1 ng/ml y con 1% de aminoácidos no esenciales, con 1% de mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 0.1 mM, con β-mercaptoetanol a una concentración final de 0.5 mM, glutamina en una concentración final de 2.1 mM, penicilina en una concentración final de 100 U/ml, estreptomycin a una concentración final de 100 µg/ml y yeastolate 1X. Rápidamente en el pase 4, la mezcla de antibióticos ya no se agrega al medio.

65 Las células ES de pato se cultivan en medio DMEM-HamF12 hasta el pase 4. Después del pase 4, el medio de base se modifica y se sustituye el medio completo DMEM-HamF12 por el medio SFM GTM-3 complementado con suero bovino fetal 10%, con IGF-1, CNTF a una concentración final de 1 ng/ml con 1% de aminoácidos no esenciales, con 1% de mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 0.1 mM, con

5  $\beta$ -mercaptoetanol a una concentración final de 0.5 mM de glutamina a una concentración final de 2.1 mM y yeastolate 1X. Las células ES de pato se cultivan adicionalmente durante 14 pases en este medio nuevo de cultivo y después se lleva a cabo la eliminación de suministros de factores de crecimiento en el paso 18. Se retiran simultáneamente IGF-1 y CNTF del medio, de esta manera, desde el paso 19 al paso 24, el medio de cultivo es medio GTM-3 complementado con FBS 10%, con aminoácidos no esenciales 1%, 1% de mezcla de vitaminas de origen comercial con piruvato de sodio a una concentración final de 0.1 mM con  $\beta$ -mercaptoetanol a una concentración final de 0.5 mM, glutamina a una concentración final de 2.1 mM y yeastolate 1X.

10 Cuando las células ES de pato de embriones de pato pequinés se hacen pasar de un recipiente de 'cultivo a otro, la siembra del recipiente de cultivo se realiza con aproximadamente entre  $7 \times 10^4/\text{cm}^2$  a  $2 \times 10^4/\text{cm}^2$  de células ES de pato en medio de cultivo completo.

15 Después, posterior al paso 24, la supresión de células alimentadoras se realiza por una disminución progresiva de la concentración de células alimentadoras durante varios pasos. Los recipientes originalmente se siembran con aproximadamente  $2.7 \times 10^4$  células alimentadoras/ $\text{cm}^2$ , después aproximadamente  $1.8 \times 10^4$  células alimentadoras/ $\text{cm}^2$  entre el paso 25 y 31, posteriormente aproximadamente  $1.4 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$  entre los pasos 32 y 35, después aproximadamente  $1 \times 10^4$  células alimentadoras/ $\text{cm}^2$  entre los pasos 36 y 41, después aproximadamente  $0.7 \times 10^4$  células alimentadoras/ $\text{cm}^2$  entre el paso 42 y 44 y finalmente desde el paso 45 los recipientes se siembran únicamente con células aviares y sin células alimentadoras. Al final de la supresión de alimentador, los recipientes se siembran con  $9 \times 10^4$  células aviares/ $\text{cm}^2$  a  $12.7 \times 10^4$  células aviares/ $\text{cm}^2$ . La supresión de células alimentadoras se inicia en el paso 25 y finaliza en el paso 45. Durante la supresión de células alimentadoras, las células ES de pato se siembran en recipientes de cultivo a una concentración mayor que en la etapa a), aproximadamente de alrededor de  $9 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$  a  $12.7 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$ .

25 Después de varios pases sin células alimentadoras, se estudia los parámetros de crecimiento (tiempo de duplicación de población (PDT) y densidad) para confirmar la estabilidad y robustez celulares y para iniciar la eliminación del suministro de aminoácidos, vitaminas,  $\beta$ -mercaptoetanol, piruvato de sodio y yeastolate. Las células se consideran suficientemente robustas para ser enviadas a dicha eliminación de suministro si PDT es menor de aproximadamente 40 horas y la densidad celular es superior de aproximadamente  $26 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$ .

30 En el caso del actual desarrollo de células EBx® de pato, denominadas EB66, la eliminación de suministro de vitaminas, piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales y  $\beta$ -mercaptoetanol se inicia en el paso 52. Todos estos aditivos se retiran simultáneamente del medio. De esta manera, entre el paso 52 y el paso 59, el medio de cultivo es SFM GTM-3 complementado con glutamina, yeastolate y FBS. Después de un período de adaptación breve a las nuevas condiciones de cultivo, se inicia la disminución de temperatura. Esta disminución se realiza progresivamente entre el paso 60 y el paso 67. Después del paso 67, las células son capaces de crecer a 37°C. Después del paso 67, el medio de base GTM-3 se sustituye por un medio de base SFM nuevo denominado Excell 65788. Así, después del paso 67, el medio de cultivo es Excell 65788 complementado con FBS 10%, glutamina 2.5 mM y yeastolate 1X. En el paso 80, se transfieren  $4 \times 10^6$  células en un recipiente Ultra Low Attachment (ULA) que se mantiene bajo agitación constante para iniciar el crecimiento de células independiente de anclaje. Para promover el crecimiento como suspensión, el medio de base se modifica y se disminuye el porcentaje de suero de 10% a 5% para la siembra en el recipiente ULA. De esta manera, del paso 80 al paso 85 el medio de cultivo es SFM GTM-3 complementado con FBS 5%, glutamina 2.5 mM y yeastolate 1X. La disminución lenta de FBS se inicia en la suspensión celular EB66 después del paso 85. La supresión de suero se realiza por una disminución progresiva comenzando desde suero 2.5% después 1.5% de concentración de suero en medio de cultivo de células SFM para finalmente llegar a 0% de suero en medio de cultivo celular SFM. La supresión de suero comienza en el paso 86 y finaliza el paso 94. Al final de la supresión de suero, las células EB66 independientes de anclaje son capaces de crecer a 37°C en ausencia de factores de crecimiento, en ausencia de células alimentadoras en medio libre de suero.

50 Después de obtener las células EB66 de pato que son capaces de crecer a 37°C en SFM GTM-3 complementado con glutamina 2.5 mM, se realiza cierta adaptación adicional del medio SFM por dilución o adaptación progresiva en formulaciones SFM nuevas como Excel 63066, Excell 66444, Excell CHO ACF, por ejemplo.

55 La subclonación de la suspensión de células EB66 de pato también se puede llevar a cabo en presencia o ausencia de yeastolate.

#### **EJEMPLO 4: Células EBx de pato. línea EB26**

##### **4.1 -MATERIAS PRIMAS**

60 Huevos de pato, células alimentadoras, aditivos, amortiguadores y fijadores, agentes crioprotectores, suero bovino fetal y agentes disociantes (Igual que en el Ejemplo 3).

65 Se utilizan huevos de pato de pato pequinés cepa GL30.

##### **Medio**

EX-CELLMR 65319, 63066 Y 66444 (SAFC, medio adaptado)



Medio GTM-3 (Sigma, n.º de catálogo G9916)  
DMEM (Cambrex, n.º de catálogo BE 12-614F)

#### Factores

5

Se utilizan seis factores recombinantes diferentes:

- Factor neurotrófico ciliar humano recombinante (CNTF) (Peprtech Inc, n.º de catálogo 450-13)
- Factor I similar a insulina humano recombinante (IGF-1) (Peprtech Inc, n.º de catálogo 100-11)
- Interleucinas 6 humanas recombinantes (IL-6) (Peprtech Inc, n.º de catálogo 200-06)
- 10  Receptor de interleucina 6 soluble humanas recombinante (sIL-6r) (Peprtech Inc, n.º de catálogo 200-06R)
- Factor de citoblastos humanos recombinantes (SCF) (Peprtech Inc, n.º de catálogo 300-07)
- Factor de crecimiento de fibroblastos básicos humanos recombinantes (bFGF) (Peprtech Inc, n.º de catálogo 100-18B)

15

Todos los factores, excepto IL-6r, se producen en bacterias *E. coli*. IL-6r soluble se expresa en células HEK293 transfectadas.

#### 4.2 -PROCEDIMIENTO DE ESTABLECIMIENTO DE LA CELULA EBx DE PATO, LINEA EB26

20

Se recolectaron embriones de pato como se ha descrito previamente con EB66. Los embriones de pato se colocaron en tubos de 50 ml que contienen PBS 1X. Los embriones de pato después se disociaron mecánicamente, se lavaron en PBS y se sembraron sobre una capa inactivada de células STO alimentadoras en medio de cultivo completo a 39°C, CO<sub>2</sub> 7.5%. Las células alimentadoras se sembraron en placas de 6 pozos o en recipientes a aproximadamente 25  $2.7 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. El medio de cultivo completo está constituido de medio libre de suero GTM-3 complementado con suero bovino fetal 5%, con IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF y FGF a una concentración final de 1 ng/ml y con 1% de aminoácidos no esenciales, con 1% de mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 0.1 mM, con (3 mercaptoetanol a una concentración final de 0.5 mM, glutamina a una concentración final de 2.1 mM, penicilina a una concentración final de 100 U/ml, estreptomycin a una concentración final de 100 µg/ml y yeastolate 1X. Rápida mente después de los primeros pases de la célula, las mezclas de antibióticos y a no se agregaron al medio. La expresión "rápida mente" se entiende que significa después de los primeros 3 a 9 pases en general. Las células ES de pato se cultivaron en medio completo hasta el pase 9. Después del pase 9 el medio completo se suprime parcialmente en factores. De esta manera, entre el pase 10 y 13, se eliminó del medio SCF, IL-6, IL-6R y bFGF y solo se mantuvo IGF-1 recombinante y CNTF a una concentración de 1 ng/ml. 35 Una disminución simultánea de la concentración de IGF-1 y CNTF es realizada en segundo lugar entre el pase 13 y 16 para obtener finalmente células capaces de crecer sin factores recombinantes en el pase 17. La supresión del factor se realiza por una adaptación progresiva a concentraciones cada vez más bajas de factores. Cuando las células ES de pato de embriones de pato pequinés se hacen pasar de un recipiente de cultivo a otro, la siembra del recipiente de cultivo se realiza con aproximadamente entre  $7 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> a  $12 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> de células ES de pato en el medio de cultivo completo. Preferiblemente, la siembra se realiza con aproximadamente  $7.3 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> ( $4 \times 10^6$  células/55 cm<sup>2</sup> o  $4 \times 10^6$  células/recipiente de 100 mm). Después de supresión de los factores recombinantes se realiza una disminución de yeastolate en el pase 23 alcanzando la concentración final a 0.5X. Después, posterior al pase 31, la supresión de células alimentadoras se realiza por una disminución progresiva de la concentración de células alimentadoras sobre varios pases. Los recipientes originalmente se siembran con aproximadamente  $2.7 \times 10^4$  células alimentadoras/cm<sup>2</sup>, después aproximadamente  $1.8 \times 10^4$  células alimentadoras/cm<sup>2</sup> entre el pase 32 y 38 y después aproximadamente  $1.4 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> entre el pase 39 y 44, después aproximadamente  $1 \times 10^4$  células alimentadoras/cm<sup>2</sup> entre el pase 45 y 47 y después de aproximadamente  $0.7 \times 10^4$  células alimentadoras/cm<sup>2</sup> entre el pase 48 al 50 y finalmente desde el pase 51 los recipientes se siembran únicamente con células aviares y sin células alimentadoras. Al final de la supresión de alimentador, los recipientes se siembran con  $9 \times 10^4$  células aviares/cm<sup>2</sup> a  $12.7 \times 10^4$  células aviares/cm<sup>2</sup>. La supresión de las células alimentadoras comienza en el pase 32 y finaliza en el pase 51. Durante la supresión de células alimentadoras, las células ES de pato se siembran en recipientes de cultivo a una concentración mayor que en la etapa a), de aproximadamente  $9 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> a  $12.7 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Después de varios pases sin células alimentadoras, se estudian los parámetros de crecimiento ( tiempo de duplicación en población (PDT) y densidad) para confirmar la estabilidad y robustez celulares e iniciar el crecimiento celular como suspensión. Se considera a las células como suficientemente robustas para ser enviadas a cultivo en suspensión si PDT es menor de aproximadamente 40 horas y la densidad celular es mayor de aproximadamente  $26 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Además, la morfología de las células debe ser: redonda, refringente, muy pequeña y las células no deben unirse al recipiente de plástico demasiado.

60

En el caso del desarrollo de células EB26, el cultivo en suspensión se inicia en el pase 53. Se transfieren  $7 \times 10^6$  células en un recipiente de unión Ultra Low y se mantienen bajo agitación constante a aproximadamente 50 a 70 rpm. Para los siguientes pases, las células se siembran en matraces T 175 (Sarstedt, ref 831 812502) a una concentración que comprende entre 0.4 y  $0.5 \times 10^6$  células/ml. Después de un período breve de adaptación a las condiciones de cultivo nuevas, las células PDT disminuyen de aproximadamente 160 H a 40 horas. Considerando esta buena evolución, en el pase 59, se realiza un nuevo grupo de eliminación de suministros. De esta manera, se retiraron vitaminas, piruvato de sodio, β-mercaptoetanol y aminoácidos no esenciales. De esta manera, después del

65

pase 59, el medio de cultivo se suplementa con FBS 5%, y yeastolate 0.5 X y glutamina 2.5 mM solamente. La supresión de suero se realiza sobre suspensiones de células ya carentes de factor de crecimiento, células alimentadoras, vitaminas, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y  $\beta$ -mercaptoetanol. La supresión de suero se realiza por una disminución progresiva comenzando desde suero 5%, después 2.5%, después 1.5% de concentración de suero en medio de cultivo celular SFM para finalmente llegar a 0% de suero en medio de cultivo celular SFM. La supresión de suero comenzó en el pase 61 y finalizó en el pase 79. Al final de la supresión de suero, las células EB26 de pato independientes de anclaje son capaces de crecer a 39°C en ausencia de factores de crecimiento, en ausencia de células alimentadoras, en medio libre de suero. Las células EB26 después se adaptan al crecimiento en ausencia de yeastolate 0.5X a 37°C al disminuir la temperatura de cultivo celular en el pase 80.

Después de obtener células EB26 que son capaces de crecer a 37°C en SFM GTM-3 complementado con glutamina 2.5 mM, se realizaron algunas adaptaciones adicionales por dilución o adaptación progresiva de formulaciones SFM nuevas como Excell 63066, Excell 66444, Excell CHO ACF. La subclonación de la suspensión de células EB26 de pato también se puede llevar a cabo en presencia o ausencia de yeastolato.

### **EJEMPLO 5. Células EBx de pato. línea EB24**

#### **5.1 -MATERIA PRIMA**

#### **Huevos de pato, células alimentadoras, aditivos, amortiguadores y fijadores, agentes crioconservadores, suero bovino fetal y agentes disociantes (idéntico al ejemplo 3).**

Se utilizaron huevos de pato pequinés cepas GL30.

#### **Medio**

Medio EX-CELL™ 65319, 63066 Y 66444 (SAFC, medio adaptado)

Medio GTM-3 (Sigma, Cat n° G9916)

DMEM F12 (Cambrex, Cat n° BE04-687)

DMEM (Cambrex, Cat n° BE 12-614F)

#### **Factores**

Se utilizaron seis factores recombinantes diferentes:

- Factor neurotrófico ciliar humano recombinante (CNTF) (Peprotech Inc, Cat n° 450-13)
- Factor I similar a insulina humana recombinante (IGF-1) (Peprotech Inc, Cat n° 100-11)
- Interleucina 6 humana recombinante (IL-6) (Peprotech Inc, Cat n° 200-06)
- Receptor de interleucina 6 soluble humano recombinante (sIL-6r) (Peprotech Inc, Cat n° 200-06 R)
- Factor de citoblastos humano recombinantes (SCF) (Peprotech Inc, Cat n° 300-07)
- Factor de crecimiento de fibroblastos básico humano recombinante (bFGF) (Peprotech Inc, Cat n° 100-18B)

Todos estos factores, excepto IL-6r se producen en bacterias *E. coli*. IL-6r se expresa en células HEK293 transfectadas.

#### **5.2 -PROCEDIMIENTO DE ESTABLECIMIENTO DE LA LINEA DE CELULAS EBx® DE PATO EB24**

Se recolectan embriones de pato como se ha descrito previamente con EB66. Los embriones de pato se colocan en tubos de 50 ml que contienen PBS 1X. Los embriones de pato después se disocian mecánicamente y se siembran sobre una capa inactivada de células STO alimentadoras en medio de cultivo completo a 39°C, CO<sub>2</sub> 7.5%. Las células alimentadoras se siembran en placas de 6 pozos o en recipientes a aproximadamente 2.7 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>. El medio de cultivo completo está constituido de medio libre de suero DMEM-HamF12 complementado con suero bovino fetal 10% con IGF-1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF y FGF a una concentración final de 1 ng/ml y con 1% de aminoácidos no esenciales con 1% de mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 0.1 mM, con  $\beta$ -mercaptoetanol a una concentración final de 0.5 mM, glutamina a una concentración final de 2.1 mM, penicilina a una concentración final de 100 U/ml, estreptomina a una concentración final de 100  $\mu$ g/ml y yeastolato 1X. Rápidamente después de los primeros pases de las células, la mezcla de antibióticos ya no se agregó más al medio. La expresión rápidamente se entiende que significa después del primero de 3 a 9 pases en general.

Las células ES de pato se cultivan en medio completo DMEM-HamF12 hasta el pase 7. Después del pase 7 el medio de base se modifica y el medio completo DMEM-HamF12 se sustituye por medio completo GTM-3 complementado con suero bovino fetal 10%, con IGF1, CNTF, IL-6, IL-6R, SCF y FGF a una concentración final de 1 ng/ml con 1% de aminoácidos no esenciales, con 1% de una mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 0.1 mM, con  $\beta$ -mercaptoetanol a una concentración final de 0.5 mM, glutamina a una concentración final de 2.1 mM, penicilina a una concentración final de 100 U/ml, estreptomina en una concentración final de 100  $\mu$ g/ml y yeastolato 1X. Por lo tanto, en el pase 11, la concentración de suero disminuye en 5% y se retiran SCF, IL-6, IL-6R y bFGF del medio. De esta manera, desde el pase 11, el medio está constituido de FBS 5%

con IGF-1 y CNTF en una concentración final de 1 ng/ml con 1% de aminoácidos no esenciales, con 1% de mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 0.1 mM, con  $\beta$ -mercaptoetanol en una concentración final de 0.5 mM, glutamina en una concentración final de 2.1 mM, penicilina en una concentración final de 100 U/ml, estreptomycin en una concentración final de 100  $\mu$ g/ml y yeastolato 1X. Se realiza una suspensión simultánea de IGF-1 y CNTF en el pase 22. No están presentes factores recombinantes en el medio de cultivo GTM-3 después del pase 22. Las células de pato se mantienen en dicho medio entre el pase 23 y el pase 28. Cuando las células ES de pato de los embriones de pato pequinés se hacen pasar de un recipiente de cultivo a otro, la siembra del recipiente de cultivo se realiza con aproximadamente entre  $7 \times 10^4/\text{cm}^2$  a  $12 \times 10^4/\text{cm}^2$  de células ES de pato en el medio de cultivo completo. Preferiblemente, la siembra se realiza con aproximadamente  $7.3 \times 10^4/\text{cm}^2$  ( $4 \times 10^6$  células/55  $\text{cm}^2$  o  $4 \times 10^6$  células/recipiente de 100 mm). Después, posterior al pase 28, se realiza la eliminación de células alimentadoras por una disminución progresiva de la concentración de células alimentadoras durante varios pases. Los recipientes originalmente se siembran con aproximadamente  $2.7 \times 10^4$  células alimentadoras/ $\text{cm}^2$ , después con aproximadamente  $1.8 \times 10^4$  células alimentadoras/ $\text{cm}^2$  entre el pase 29 y 33, después aproximadamente  $1.4 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$  entre el pase 34 y 37, después aproximadamente  $1 \times 10^4$  células alimentadoras/ $\text{cm}^2$  entre el pase 38 y 42, después con aproximadamente  $0.7 \times 10^4$  células alimentadoras/ $\text{cm}^2$  entre el pase 43 y 46. Y finalmente desde el pase 47 los recipientes se siembran únicamente con células aviares y sin células alimentadoras. Al final de la supresión de alimentador los recipientes se siembran con  $9 \times 10^4$  células aviares/ $\text{cm}^2$  a  $12.7 \times 10^4$  células aviares/ $\text{cm}^2$ . La eliminación de células alimentadoras comienza en el pase 29 y finaliza en el pase 47. Durante la eliminación de las células alimentadoras, las células ES de pato sembradas en recipientes de cultivo a una concentración mayor que en la etapa a), a aproximadamente de alrededor de  $9 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$  a  $12.7 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$ . Después de varios pases sin células alimentadoras, se estudiaron los parámetros de crecimiento (tiempo de duplicación de población (PDT) y densidad) para confirmar la estabilidad y robustez de las células y para iniciar el crecimiento celular como una suspensión. Las células se consideran como suficientemente robustas para ser enviadas a un cultivo de suspensión si el PDT es menor de aproximadamente 40 horas y la densidad celular es mayor de aproximadamente  $26 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$ . Además, la morfología de las células debe ser: redonda, refringente, muy pequeña y las células no deben estar unidas al recipiente de plástico demasiado. En el caso del desarrollo de células EB24, el cultivo en suspensión se inicia en el pase 48. Se transfieren  $8 \times 10^6$  células en un recipiente de unión Ultra Low y se mantienen bajo agitación constante a aproximadamente 50 a 70 rpm. Para los siguientes pases, las células se siembran en matraces T 175 (Sarsted, ref 831812502) a una concentración que comprende entre 0.4 y  $0.5 \times 10^6$  células/ml. Después de un período breve de adaptación a las condiciones de cultivo nuevas, las células PDT disminuyen de aproximadamente 248 H a 128 horas y la siguiente etapa de supresión se lleva a cabo después. De esta manera, en el pase 52, se han eliminado las vitaminas, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y  $\beta$ -mercaptoetanol. Respecto a la buena evolución de PDT al alcanzar las 44 horas, en el pase 56, desde el pase 57, se inicia la eliminación de suministro de suero. De esta manera, desde el pase 57, el medio de cultivo GTM-3 se suplementa con FBS 5%, y yeastolato 1X y glutamina 2.5 mM, únicamente. La eliminación de suministro de suero se realiza en suspensiones de células que ya se les ha eliminado el suministro de factores de crecimiento, células alimentadoras, vitaminas, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y  $\beta$ -mercaptoetanol. La eliminación del suministro de suero se realiza por una disminución progresiva comenzando con suero 5%, después 2.5%, posteriormente 2%, después 1.5% de concentración de suero en medio de cultivo de células SFM para finalmente alcanzar 0% de suero en medio de cultivo de células SFM. La eliminación de suministro de suero comienza en el pase 57 y termina en el pase 77. Durante esta eliminación de suministro de suero, también se realiza la adaptación para crecimiento a 37°C. De esta manera, en el pase 65, las células que crecen en medio de cultivo complementado con FBS 2.5% se transfieren a 37°C evitando un desplazamiento de temperatura progresivo. Al final de la eliminación de suministro de suero, las células EB24 de pato independientes de anclaje son capaces de crecer a 37°C en ausencia de factores de crecimiento, en ausencia de células alimentadoras, en medio libre de suero.

Después de obtener células EB24 de pato capaces de crecer a 37°C en SFM GTM-3 complementado con glutamina 2.5 mM, se realiza cierta adaptación adicional por dilución de la adaptación progresiva en formulaciones nuevas de SFM como Excell 63066, Excell 66444, Excell CHO ACF. La subclonación de la suspensión de EB24 de pato se realiza y se selecciona un subclón de EB24-12 de pato debido a su buen desempeño para replicar eficazmente virus.

#### **EJEMPLO 6: Línea de células EBx de pato Muscovy SPF**

##### **6. -MATERIA PRIMA**

##### **Huevos de pato:**

Se obtienen huevos SPF de pato de las cepas Muscovy de Le Couvoir de Cerveloup (Francia). Estos huevos de pato SPF se producen a partir de una parvada analizada intensamente en búsqueda de diversos patógenos para aves de corral. Las enfermedades probadas incluyen: Salmonella gallinarum-pullorum, Mycoplasma synoviae, Mycoplasma meleagridis, Mycoplasma gal liepticum, virus de enfermedad de Marek, influenza aviar, paramixovirus tipo 2, paramixovirus tipo 3, enfermedad de Newcastle, adenovirus tipo 3 (EDS), enfermedad de Gumboro, reovirus aviar, virus de retículoendoteliosis, encefalomielitis aviar, rinotraqueitis infecciosa y clamidiosis. Los huevos de pato Muscovy se envían únicamente a desinfección con el descontaminante para evitar cualquier riesgo de contaminación relacionado con la manipulación de huevos durante el transporte.

##### **Células alimentadoras (véanse ejemplo anteriores)**

**Medios**

- Medio EX-CELL™ MR 66444 (SAFC, medio adaptado)  
 Medio GTM-3 (Sigma, Cat no G9916)  
 5 DMEM-Ham F 12 (Cambrex, Cat no BE04-687)

**Aditivos**

- 10 glutamina (Cambrex, Cat no BE17-605E)  
 Penicilina/estreptomicina (Cambrex, Cat no BE17-602E)  
 aminoácidos no esenciales (Cambrex, Cat no BEI3-114E)  
 piruvato de sodio (Cambrex, Cat no BE13-115)  
 vitaminas (Cambrex, Cat no 13-607C)  
 15 β-mercaptoetanol (Sigma, Cat no M7522)  
 Yeastolato (SAFC, Cat no 58902C)

**Amortiguadores y fijadores**

- 20 PBS IX (Cambrex, Cat no BE17-6516F)  
 Agente crioprotector  
 sulfóxido de dimetilo (DMSO) (Sigma, Cat no D2650)

**Factores**

Se utilizaron dos factores recombinantes diferentes:

- 30  Factor neurotrófico ciliar humano recombinante (CNTF) (Peprotech Inc, Cat no 450-13)  
 Factor I similar a insulina humana recombinante I(IGF1) (Peprotech Inc, Cat no 100-11)

Estos dos factores se producen en bacterias *E. coli*.

**Suero Bovino Fetal**

- 35 **Suero bovino fetal (FBS) no irradiado (JRH, Cat No. 12003)**

40 El suero no irradiado utilizado en el programa se recolecta y produce en Australia. Los animales utilizados para la recolección son inspeccionados por USDA y aceptables para matanza. Se ha agregado en el medio durante el cultivo de citoblastos aviares. Este lote no se envía a irradiación para evitar la destrucción de proteínas críticas o componentes identificados como esenciales para el mantenimiento de los citoblastos en cultivo.

**Suero irradiado (JRH, Cat no 12007)**

45 El lote irradiado utilizado en este programa se recolecta en Australia. Este lote irradiado se agrega como suplemento en el medio DMEM utilizado para el cultivo de células STO (células alimentadoras). Estas células no requieren como citoblastos una cantidad específica de suero para crecimiento y mantenimiento en cultivo. Para minimizar la alta concentración de suero en el medio hemos adaptado células STO para que crezcan en presencia de 4% de FBS únicamente.

50 Agentes de disociación

- 55 •Pronasa (Roche, Cat no 165 921)  
 •Trypzean (Sigma, cat no T3449)

**6.2 -PROCEDIMIENTO DE ESTABLECIMIENTO DE LINEAS DE CELULAS EBx DE PATO MUSCOVY**

Los embriones de 20 h huevos SPF fertilizados de patos Muscovy se recolectan de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 3. Los embriones de pato se colocan en tubos de 50 ml que contienen PBS 1X. Los embriones de pato después se disocian mecánicamente, se lavan con PBS y se siembran en un pozo de una placa de 12 pozos recubierta con una capa inactivada de células STO alimentadoras. Las células embrionarias de pato se siembran en medio de cultivo completo y se transfieren a 39° C, CO<sub>2</sub> 7.5% 5%. Las células alimentadoras se siembran a aproximadamente 2.7 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>. El medio de cultivo completo utilizado está constituido de DMEM-Ham F12 complementado con suero bovino fetal 10% con IGF1, CNTF, a una concentración final de 1 ng/ml y con 1% de aminoácidos no esenciales con 1% de mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 0.1 mM, con β-mercaptoetanol a una concentración final de 0.5 mM, glutamina en una concentración final de 2.1 mM, penicilina en una concentración final de 100 U/ml, e streptomycin en una concentración final de 100 µg/ml y yeastolato 1X. En el pase 2, el medio de base DMEM-HamF12 se sustituye por

medio de base GTM-3. La mezcla de antibióticos ya no se agrega al medio después del pase 4.

Las células ES de pato se cultivan en medio GTM-3 completo hasta el pase 8. Después del pase 8, la concentración de IGF-1 y CNTF se reduce a 0.5 ng/ml. Las células ES de pato se cultivan adicionalmente durante el pase 2 en este medio nuevo de cultivo y después se realiza eliminación de suministro de factor de crecimiento en el pase 10. Se retiran del medio simultáneamente IGF1 y CNTF.

Así, desde el pase 10 hasta el pase 37, el medio de cultivo es medio GTM-3 complementado con FBS 10%, con 1 % de aminoácidos no esenciales, con 1 % de mezcla de vitaminas de origen comercial, con piruvato de sodio a una concentración final de 0.1 mM, con  $\beta$ -mercaptoetanol en una concentración final de 0.5 mM, glutamina en una concentración final de 2.1 mM, y yeastolato 1X.

Cuando las células ES de pato aisladas de embriones de pato Muscovy se hacen pasar de un recipiente de cultivo a otro, la siembra se realiza con aproximadamente  $1.2 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> de células ES de pato en el medio de cultivo. Ocasionalmente se utiliza cierto medio acondicionado para siembra de células para mejorar la recuperación de células después de la disociación.

Posteriormente, después de la etapa 37, se realizan las upresión de células alimentadoras por una disminución progresiva de la concentración de células alimentadoras durante varios pases siguiendo el procedimiento etapa por etapa descrito previamente.

Durante esta fase de eliminación de suministro de alimentador, algunas células son capaces de crecer en suspensión, se aíslan y adaptan para crecer sin aditivos y suero (figura 4C). Las células EBx de pato Muscovy independientes de anclaje que expresan marcadores de células ES tales como telomerasa, SSEA-1 y EMA-1 (datos no mostrados).

#### **EJEMPLO 7: Caracterización de líneas de células IEBx**

##### **7.1 - CARACTERIZACION DE CELULAS VAILO EBv13 DE POLLO**

###### **7.1.1 -Actividad de Telomerasa**

La detección de telomerasa se obtiene mediante la utilización del sistema *Telo* TAGGG telomerasa PCR ELISA desarrollado por Roche Applied Science (Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) -Cat. No. 11 854 666 910) de acuerdo con los procedimientos del proveedor. El sistema *Telo* TAGGG Telomerase PCR ELISA permite la amplificación de productos de alargamiento mediados por telomerasa combinados con detección no radiactiva siguiendo un procedimiento ELISA. El análisis es válido si el valor de absorbancia del control negativo es menor que o igual a  $0.25 A_{450nm} - A_{690nm}$  y si el valor de absorbancia del control positivo es mayor que o igual a  $1.5 A_{450nm} - A_{690nm}$  cuando se utiliza  $1 \times 10^3$  equivalentes de células en el análisis. Las muestras se consideran como positivas a telomerasa si la diferencia en la absorbancia es superior a  $0.2 A_{450nm} - A_{690nm}$  unidades. Se utilizan dos controles: el control negativo son fibroblastos murinos (células FED) y los controles positivos son células FGB8 (embriocitoblastos establecidos por Vivalis de embriones de ratón 129 SV) y células EB14-O74 de pollo previamente establecidas en el documento WO 03/076601.

Los resultados que se obtienen se resumen en la figura número 2. Las células EBv13 expresan un alto nivel de telomerasa. En el pase p193 y 195, la actividad de telomerasa es equivalente a una de células EB14-O74 de pollo.

###### **7.1.2 -Marcadores biológicos de células ES**

Los embrioncitos están caracterizados por la expresión de marcadores biológicos expresados sobre la membrana celular. Se evaluó la expresión de EMA-1 (antígeno 1 de membrana epitelial) y SSEA-1 (antígeno 1 embrionario específico de etapa) en células EBv13 por análisis FACS. Después de 10 minutos con fijación con PFA 4% (paraformaldehído), las muestras celulares y los controles se enjuagaron y preincubaron con anticuerpos monoclonales específicos para EMA-1 o SSEA-1. Se utilizó un segundo anticuerpo conjugado a FITC para detección de células que expresan los 2 marcadores biológico seleccionados. Las muestras se analizan por citometría de flujo utilizando un FACS (clasificador de células activado por flujo) de Coulter.

El análisis FACS se realiza en células de fibroblastos de ratón (células FED) como un control negativo, células ES FGB8 murinas como un control positivo, células EB14-O74 de pollo como un control positivo de células EBx y células Ebv13. Como se esperaba, las células FED no expresan marcadores biológicos mientras que las células FGB8 y EB14-O74 presentan una tinción importante, respectivamente, de 60.13% y 78.7 para EMA-1 y de 94.45% y 95% para SSEA-1 (datos no mostrados). La población de células valo EBv13 de pollo no presentan ninguna tinción para EMA1 (2%) y una muy ligera para SSEA-1 (22%).

###### **7.1.3 -Cariotipo**

Se realizó análisis de cariotipo para verificar la diploidia de células y el origen aviar de células EBv 13. Las células en la fase exponencial de crecimiento se cosechan y tratan 2 horas por colcemide (0.02  $\mu$ g/ml). Después de lavado y centrifugación se produce un choque hipotónico en células con KCl (0.56%) durante 20 minutos. Posteriormente se

fijan células EBv13 en metanollácido acético (3/1) y se almacenan durante la noche a -20°C. Al día siguiente, se realiza metafasis por puntos en vidrio, se tñen por una solución de Wright/Giemsa y se observan bajo el microscopio. Se observan varias series de metafasis que confirman el origen de pollo de las células Ebv13. No se observan pruebas de poliploidia.

#### 5 **7.1.4 -Influencia de la composición de medio de cultivo celular sobre el tamaño de los grumos de células EBv13**

10 Los inventores han encontrado que la concentración de calcio y magnesio en el medio libre de suero utilizado para el cultivo de células EBx y la infección tienen un impacto en el tamaño de los grumos.

La figura 10 muestra la disminución en el tamaño de los grumos cuando se hacen pasar a las células EBv13 de un medio con una concentración alta a una baja de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>.

## 15 **7.2 -CARACTERIZACION DE LA LINEA DE CELULAS EBx DE PATO**

### **7.2.1 -Morfología de las células EBx de pato**

20 El análisis por microscopía electrónica de transmisión de células dEBx® se realiza por el Doctor A Rivoire (Lyon, Francia). Las células EBx® de pato muestran una morfología de embriocitoblastos típica (es decir, una relación alta núcleo-citoplasma) que recuerda el fenotipo de embriocitoblastos murinos y células EB14 VIVALIS descritas en el documento WO2006/108846. Las células EBx® de pato son células redondas pequeñas (diámetro ~10 µm) con un núcleo grande y nucleolo, con pseudópodos cortos que se extienden desde la membrana plasmática (figura 4). Son altamente activos metabólicamente con un citoplasma rico en ribosomas y mitocondrias. Contienen numerosas vacuolas intracelulares, un sistema de Golgi muy desarrollado y un retículo endoplasmático granuloso.

### **7.2.2 -Expresión de telomerasa de células EBx® de pato**

30 Se investigó la expresión de telomerasa durante diferentes etapas de establecimiento en células EBx® de pato mediante la utilización del equipo de detección de telomerasa de Roche (Telomerase OCR ELISA). Se encontró que la telomerasa se encuentra altamente expresada en células EBx® de pato adherentes así como durante la eliminación del suministro de alimentador, durante el procedimiento de adaptación de las células EBx® de pato a suspensión y durante la eliminación del suministro de alimentador. La figura 5 muestra que EB24 y EB26 de pato presentan un alto nivel de telomerasa, de manera similar a las células EB14 de pollo. EB66 de pato también expresa un alto nivel de telomerasa en todos los pases celulares. Esta elevada actividad de telomerasa es estable en células EB66 después de adaptación en diferentes SFM (figura 15).

### **7.2.3 -Las células EBx® de pato no muestran actividad de transcriptasa inversa endógena**

40 Se investigó la expresión de transcriptasa inversa endógena mediante el análisis F-PERT directo (Lovatt et al., 1999, J. Viral. Methods, 82: 185-200) en células Clean (FRANCE). Las líneas celulares EBx® de pato, EB24 (datos no mostrados), EB66 (datos no mostrados), EB26 y EB51 no muestran actividad de transcriptasa inversa (RT) endógena (figura 6A). La actividad RT se detectó en cultivo de células EB14 de pollo así como, en menor grado, el fibroblasto embrionario de pollo derivado de una cepa de pollo libre de patógenos específicos (SPF).

45 La presencia de partículas retrovíricas endógenas, ya sea replicantes o no replicantes en el sobrenadante de cultivo celular de células EBx® de pato y pollo se investigó por un análisis de ELISA que detecta el antígeno P27 de cápside principal de leucosis aviar (figura 6B). Todas las líneas de células EBx® de pato (EB26, EB51, EB24, EB66...), así como EBv13 de pollo no se secretan el antígeno p27 de ALV. Por el contrario, las células EB14 de pollo expresan el antígeno P27 de ALV.

### **7.2.4 -Las células EBx de pato no secretan virus de leucosis aviar replicante (ALV)**

55 El análisis de co-cultivo de células Ebx de pato con la línea de células QT6 de codorniz, que se sabe es sensible a ALV endógeno y exógeno, se realizó para detectar la presencia de virus de pato replicante endógeno. La figura 7A describe el principio del co-cultivo de QT6. La presencia del virus replicante se detecta por un análisis de ELISA que detecta el antígeno P27 de cápside principal de leucosis aviar. El análisis demuestra que ninguna de las células EBx de pato probadas secreta ALV replicante (es decir, capaz de replicación) (figura 7B).

### **60 7.2.5 - Las células EBx de pato expresan receptores de virus de influenza aviar y humano**

Se llevó a cabo la detección de receptores para virus de influenza aviar (Siaα2-3Gal) y humano (Siaα2-6Gal) en células EBx de pato por análisis de clasificación de células fluorescente mediante la utilización de lectinas marcadas con digoxigenina (Boehringer):

- 65
- lectina de aglutinina de *Sambuca nigra* (SNA) que se une específicamente a Siaα2-6Gal;
  - lectina de aglutinina de *Maackia amurensis* (MAA) que se une específicamente a Siaα2-3Gal.

Las células EB14 de pollo y EBx de pato se lavan en HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5 y se resuspenden en el mismo amortiguador a una concentración final de  $5 \cdot 10^6$ . Las células se incuban durante 30 min en hielo, y después durante 15 a 30 minutos adicionales en presencia de SNA o MAA. Las células tratadas con lectina se lavan en HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5 antes de su incubación en hielo durante 15 a 30 minutos con anticuerpo anti-digoxigenina marcado con FITC. Después las células se lavan con NaCl 0.9% y se analizan por FACS.

Las células EB 14 de pollo y EBx de pato expresan receptores en la superficie celular que comprenden oligosacáridos con residuos Sia $\alpha$ 2-6Gal y Sia $\alpha$ 2-3Gal (figura 8).

## 10 7.2.6 -Cariotipo

El análisis de cariotipo se realiza para verificar la diploidia celular y el origen aviar de las células EB24 de pato y EB66. Las células en la fase exponencial de crecimiento se cosechan y se tratan de 3 a 6 horas con colcemid (0.6 mg/ml). Después de lavado y centrifugación se realiza choque hipotónico sobre células con KCl (0.56%) durante 20 minutos. Posteriormente las células EB24 y EB66 de pato se fijan en metanol/ácido acético (3/1) y se almacenan durante la noche a -20°C. Al día siguiente la metafasis se pone por puntos sobre vidrio, se tiñe con una solución de Wright/Giemsa y se observan bajo microscopio.

Se observan varias series de metafasis que confirman el origen de pato de las células EBx. No se observan pruebas de poliploidia. La figura 16 muestra el cariotipo diploide de células EBx66 de pato (figura 16).

### **EJEMPLO 6: Replicación de poxvirus en la línea de células EBv13 de pollo**

La susceptibilidad de células EBv13 a infección con poxvirus se investiga utilizando una variolovacuna modificada recombinante de Ankara (MVA) que codifica para un gen GFP (proteína fluorescente verde).

Se utilizó el siguiente procedimiento: tres días antes de la infección se sembraron  $0.4 \times 10^6$  células EBv13 (pase 188)/ml en matraces T 175 bajo 40 ml de SFM Excell 65 319 (SAFC) complementado con glutamina 4 mM. La infección se realiza a una multiplicidad de infección de  $10^{-2}$  TCID<sub>50</sub>/célula (el concentrado de MVA-GFP está a  $10^9.7$  TCID<sub>50</sub>/ml). Una hora después de la infección, se agregan al matraz 60 ml de medio fresco. El cultivo y la infección se realizan a 37°C, CO<sub>2</sub> 7.5% y se agita a 60 rpm. Cada día después de la infección se recolecta un alícuota de la suspensión celular y se congela. Al final del análisis de cinética se realiza una evaluación de la productividad siguiendo TCID<sub>50</sub>. Brevemente, la titulación del virus MVA-GFP infeccioso se realiza en células DF-1. Las células se siembran en placas de 96 pozos de fondo plano a una densidad de  $15 \times 10^3$  células/pozo en medio DMEM (Biowhittaker) complementado con suero bovino fetal 5% (FCS) (SAFC) y L-glutamina 2 mM (Biowhittaker). A las veinticuatro horas después, las células se infectan con muestras diluidas seriadas decimales en DMEM y se incuban durante una semana a 37°C, CO<sub>2</sub> 5% en una atmósfera humidificada. Se mide la infectividad del virus mediante observación microscópica del efecto citopático global (CPE) y células infectadas expuestas a radiación UV. Después se calculan los títulos TCID<sub>50</sub> de acuerdo con el método de Reed y Muench (1938, A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27, 493-97). Durante todo el experimento se monitorean la proliferación y viabilidad celulares. Las células Valo EBv13 de pollo parecen ser altamente sensibles a la infección por MVA-GFP (figuras 3A-3B).

### **EJEMPLO 8: Replicación de poxvirus en líneas de células EBx de pato**

La susceptibilidad de células EBx de pato a infección con poxvirus se investigó utilizando variolovacuna modificada recombinante Ankara que codifica para un GFP. La titulación de virus se realizó como se ha descrito previamente para células EBv13 de pollo.

## 50 8.1 -Método de cultivo celular

Las células EBx de pato se almacenan en frascos criogénicos en nitrógeno líquido a -196°C ( $20 \times 10^6$  células/frasco). El frasco criofrasco se recalienta directamente en un baño maría calentado previamente a +37°C. La suspensión de células se coloca en un tubo estéril de 50 ml con 30 ml de medio de cultivo calentado previamente. Después de centrifugación (5 min a  $300 \pm 20$  g, a temperatura ambiente), se agregan 15 ml de medio de cultivo fresco en el sedimento y se homogeniza suavemente. La muestra se numera utilizando azul de tripan. La numeración debe ser  $\geq 20 \times 10^6$  células y la disponibilidad debe ser de  $> 70\%$  para garantizar un buen cultivo.

La suspensión celular se siembra en placas, en un matraz T75 cm<sup>2</sup> y se incuban a +37°C bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub> 7.5% en un agitador orbital a 50 rpm. Después se agrega diariamente medio fresco. Las células después se someten a pase para incrementar la biomasa de células para sembrar en un biorreactor 3 L. Se necesitan  $320 \cdot 10^6$  células para inocular un biorreactor de 3 L. Se toma una muestra después de mezclado ligero para realizar una numeración utilizando azul de tripan para determinar la densidad celular. Se prepara una mezcla de células de 150 ml con el fin de obtener una concentración de células de  $0.4 \times 10^6$  células.ml<sup>-1</sup> en los 800 ml de volumen de cultivo final en el biorreactor. Antes de la siembra de células, se ajusta el pH en el recipiente a 7.2 (debido a que el pH disminuirá por inyección de CO<sub>2</sub> en la superficie). Se ajusta la pO<sub>2</sub> a 50% de saturación de O<sub>2</sub> (el controlador de flujo de masa se ajusta a 100%, que corresponde a un caudal de purgado máximo de 50 ml.min<sup>-1</sup>). Al inicio del procedimiento, se mantiene el pH por inyección de CO<sub>2</sub> en la superficie, posteriormente, se controla por adición de NaHCO<sub>3</sub> 7.5%. La

inyección de aire en la superficie se inicia con aire a un caudal de 0.3 ml.min<sup>-1</sup>. La numeración de células se realiza en una base rutinaria.

Después de 3 días de cultivo, la densidad celular debe ser mayor de 4-5 x 10<sup>6</sup> células.ml<sup>-1</sup>. Si se alcanza la densidad celular esperada, la infección por virus se realiza a una MOI de 10<sup>4</sup>. Se ajusta la temperatura del recipiente a 33°C. La cepa del virus se calienta en hielo. La mezcla de infección se prepara en 10 ml de medio de producción. Después de inoculación de la mezcla de infección en el biorreactor se realiza la adsorción vírica durante 1 hora. Se prepara el medio de producción final: en 1.5 L de medio de producción se agrega tripsina con el fin de obtener una concentración final en el recipiente de 0.3 U.ml<sup>-1</sup> (2.3 L en el total). Después se agrega el medio de producción final calentado previamente. Cada día una muestra de aproximadamente 15 ml se recolecta del biorreactor para realizar numeración de células, análisis de morfología celular y observar CPE. Los metabolitos tales como glutamato, glutamina, lactato y glucosa se analizan durante el cultivo con el programa BioProfile Basic. La concentración de los metabolitos se ajusta si es necesario. Por ejemplo, la concentración de glutamina se ajusta a 2 mM, si es necesario. La concentración de glucosa se ajusta a 2 g.L<sup>-1</sup>, si es necesario.

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

## **8.2 -Resultados**

### **8.2.1 -Cinética de crecimiento celular de células EBx® de pato en un biorreactor de alimentación por lotes de 3L**

Las células EBx® de pato se cultivan rutinariamente en un biorreactor de tanque agitado. La biomasa derivada de EBx® de pato se permite que se acumule a 37°C en un medio de crecimiento celular hasta que se alcanza una densidad celular de 5-6.10<sup>6</sup> células/ml. Después la mezcla se diluye durante aproximadamente 3 a 10 veces y se sigue la cinética de crecimiento durante un período de 10 días. En dichas condiciones, la densidad celular de 12 a 20 millones de células/ml se alcanza rutinariamente de manera habitual entre el día 5 y 8. De esta manera, las células EBx® de pato muestran una gama de relación de división que avanza a por lo menos hasta 10 a 15 veces.

### **8.2.2 -Influencia de la composición del medio de cultivo celular sobre el tamaño de los grumos durante la infección de virus MVA-GFP de células EBx de pato**

Los inventores han encontrado que la concentración de calcio y magnesio en el medio libre de suero utilizado para el cultivo de células EBx y la infección pueden tener un impacto sobre el tamaño de los grumos. La presencia de grumos pequeños de células EBx de pato mejora la infección y propagación de virus, que deja títulos de virus MVA altos (figura 9A).

### **8.2.3 -Producción de virus MVA en biorreactor 3L**

Se permite que la biomasa derivada de EBx® de pato se acumule durante la fase de proliferación celular en medio de crecimiento Excell 66444. Las células después se infectan con 10<sup>-2</sup> TCID<sub>50</sub>/célula de virus MVA-GFP y la mezcla se diluye en medio de producción Excell 66444. Después de la adición del medio Excell fresco, la densidad celular descende en el día 2, y en día 4 la densidad celular de las células infectadas aumenta y alcanza 12 millones de células/ml. En dichas condiciones, la productividad de MVA-GFP es elevada. puesto que en el día 4 post-infección el título MVA-GFP es de aproximadamente 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/ml (figura 9B). Se obtiene un rendimiento de MVA-GFP de 205 TCID<sub>50</sub>/célula en células EBx® de pato.

## **EJEMPLO 9: Producción de virus de influenza en líneas EBx de pato**

### **9.1 -Materiales y Métodos**

#### **9.1.1 -Análisis de infectividad de virus de influenza (TCID<sub>50</sub>)**

La titulación del virus de influenza infeccioso se realiza en células MDCK. Brevemente, las células se siembran en placas de 96 pozos de fondo plano a una densidad de 3 x 10<sup>3</sup> células/pozo en medio UltraMDCK complementado con L-glutamina 2.5 mM. A las veinticuatro horas después las células se infectan con muestras diluidas seriadas decimales en UltraMDCK que contiene 6 µg.ml<sup>-1</sup> de tripsina-EDTA y se incuban durante una semana a 33°C, CO<sub>2</sub> 5% en una atmósfera humidificada. La replicación del virus después se prueba en un análisis HA utilizando eritrocitos de pollo y se calculan los títulos TCID<sub>50</sub> de acuerdo con el método de Reed y Muench (1938)\*.-\*Reed L, Muench H, 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27,493-97.

#### **9.1.2 -Análisis de inmunodifusión radial única (SRID)**

La concentración de hemaglutinina en las muestras derivadas de células EB14 infectadas con virus de influenza se determina como se describe por Wood y colaboradores\*. Brevemente se recubren placas de vidrio con un gel de agarosa que contiene suero anti-influenza (concentración recomendada proporcionada por NIBSC). Después de que el gel ha fraguado, 10 µl de diluciones apropiadas de la referencia y las muestras se cargan en pozos perforados de 3 mm Ø. Después de una incubación durante 18-24 h en una cámara húmeda a temperatura ambiente las placas se



humedecen en NaCl 0.9% y se lavan con agua destilada. El gel después se prensa y seca. Las placas se tiñen con solución azul brillante de Coomassie durante 15 min y se destiñen dos veces en una mezcla de metanol y ácido acético hasta que se vuelven visibles las zonas teñidas definidas claramente. Después de secado de las placas, se mide el diámetro de las zonas teñidas que rodean a los pozos de antígeno en dos direcciones en ángulos rectos. Se construyen las curvas dosis-respuesta de diluciones de antígeno contra la superficie y los resultados se calculan de acuerdo con los métodos de análisis de pendiente-relación estándar. \*Wood JM. E t a l." An improved single-radial-immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: application for potency determinations of inactivated whole virus and subunit vaccines" (J. Biol. Stand., 1977,5(3): 237-47).

### 10 9.1.3 -Análisis de transferencia Western de proteína de hemaglutinina de influenza

Se realiza SDS-PAGE como se describe por Laemmli UK (1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 259: 680-685) en gel de poliacrilamida 10%. Las proteínas desnaturalizadas (SDS 1%,  $\beta$ -mercaptoetanol 70 mM) se transfieren a una membrana de difluoruro de polivinilideno (hybond P, Amersham) mediante un procedimiento de transferencia semi-seca (Kyhse-Andersen J (1984) Electroblooming of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose (J Biochem Biophys Methods 10: 203-209). Las manchas se bloquean durante 1 h a temperatura ambiente con una mezcla constituida de 5% de grasa de polvo de leche seca en TBST complementado con FCS 1% (SAFC). Después las manchas se incuban durante la noche en solución de bloqueo complementado con suero anti-Ha de borrego policlonal específico (1:500 (NIBSC). Las manchas se lavan 6 veces con TBST y se incuban durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG de borrego conjugado con harp (1:5000 (Rockland) en solución de bloqueo. Después de 6 lavados con TBST, el complejo de proteína conjugada final se muestra utilizando quimioluminiscencia (equipo ECL, Amersham) y películas (Hyperfilm, Amersham).

## 25 9.2 - Infección por virus de influenza de células EBx® de pato en biorreactor 3L

### 9.2.1 - Materiales y equipo

#### 30 Material de recalentamiento de células

- Matracas T75 cm<sup>2</sup> (Sarstedt, Cat# 831813502)
- medio de cultivo (medio libre de suero)
- L-glutamina 200 mM (Biowhittaker, Cat# BE17-605E)
- agitador orbital IKA KS260 (Fisher Bioblock, Cat# F35044)

#### 35 Material de amplificación celular

- matracas T175 cm<sup>2</sup> (Sarstedt, Cat# 831812502)
- medio de cultivo (medio libre de suero): Excell 65319 (JRH, Cat# 65319-1000M1687) adicionado con glutamina 2.5 mM
- L-glutamina 200 mM (Biowhittaker, Cat# BE 17-605E)
- D (+) glucosa (45%) (Sigma, Cat# G8769)

#### 45 Material de producción

- Medio de producción (medio libre de suero): Excell 65629 (JRH, Cat# 65629) complementado con glutamina 2.5 mM
- L-glutamina 200 mM (Biowhittaker, Cat# BE17-605E)
- D (+) glucosa (45%) (Sigma, Cat# G8769)
- trypzean 1 x (Sigma, Cat# T3449)
- solución de bicarbonato de sodio 7.5% (Sigma, Cat# 205-633-8)
- cepa de virus de influenza (congelada a -80°C)

### 9.2.2 -Método de cultivo celular

55 (idéntico a la replicación de MV A - ejemplo 7.1)

La titulación de virus, los análisis de hemaglutinina (HAU) y las cuantificaciones de antígeno HA (transferencia Western, SRID) se llevan al cabo al final del experimento utilizando todas las muestras recolectadas.

## 60 9.3 -Resultados

Los inventores mostraron que las células EBx de pato son un sustrato celular confiable y eficiente para la replicación de diversas cepas A Y B de virus de influenza. La producción de virus de influenza se puede realizar en diversos recipientes tales como matracas y centrifugadores (datos no mostrados) y biorreactores. Se obtuvieron por los inventores procedimientos de elaboración por fermentación o por lotes reproducibles y eficientes de virus de influenza en biorreactores de tanque de agitación de 3L y 30L. El rendimiento vírico superior a 15 mg/l y de hasta 50 mg/l de hemaglutinina habitualmente se obtienen en matracas y en biorreactores con las cepas A y B del virus de influenza (figuras 11 y 12).

**EJEMPLO 10: Replicación de virus de enfermedad de Newcastle en líneas celulares EBx de pato**

Se investigó la susceptibilidad de células EBx de pato para infección con virus de enfermedad de Newcastle utilizando la cepa NDV La Sota.

5

**10.1 -Métodos**

Se hace crecer células EBx® de pato en medio Excell (SFAC) en matraces T175 a 37°C bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub> 7.5% en un agitador orbital a 60 rpm. En el día 0, las células se siembran a 0.4 x 10<sup>6</sup> células/ml en 40 ml de medio fresco. El cultivo celular se incuba a 37°C, CO<sub>2</sub> 7.5% bajo agitación (60 rpm). La cinética de crecimiento celular es seguida hasta que la densidad celular ha alcanzado una concentración entre 4 x 10<sup>6</sup> a 6 x 10<sup>6</sup> células/ml (habitualmente en el día 3 posterior a la siembra). En ese punto, las células se inoculan con NDV cepa La Sota en dos MOI diferentes (10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup> TCID<sub>50</sub>/células) y se incuban durante una hora adicional a 37°C, CO<sub>2</sub> 7.5% bajo agitación (60 rpm). Después el cultivo celular se diluye con la adición de 60 ml de medio de producción vírica fresco y la incubación continúa a 37°C y CO<sub>2</sub> 7.5% bajo agitación (60 rpm). El crecimiento celular y la cinética de producción de virus se realizan durante 7 días. Como una fuente de proteasa se agregan cada día tripsina recombinante (SAFC) en el medio de cultivo; se prueban dos concentraciones de tripsina (0.4 y 0.75 USP/ml). Se extraen alícuotas diariamente para numeración celular, titulación de virus y análisis de transferencia Western.

Las muestras se separan utilizando 10% de SDS-PAGE y se siembran por puntos sobre una membrana PDVF (Amersham) por la técnica semi-seca. La inmunodetección se realiza utilizando antisuero poli clonal de pollo contra NDV (1:2000, CHARLES RIVER Laboratories), seguido por anticuerpo de conejo antipollo conjugado con fosfatasa alcalina (1:5000, SIGMA). El anticuerpo secundario unido se detecta utilizando el equipo de sistema de detección ECL-Chemiluminescence (ROCHE).

25

**10.2 - Resultados**

Las células EBx de pato y pollo son sensibles y se replican en NDV cepa La Sota. Los títulos (en TCID<sub>50</sub>/ml) de NDV producidas en células EBx® de pato aumentan del día 0 a al día 2, pi, hasta alcanzar un promedio de 10<sup>6.83</sup> TCID<sub>50</sub>/ml (figura 13, panel izquierdo).

30

El análisis de transferencia Western (figura 13, panel derecho) muestra la expresión de proteínas víricas NDV (HN, Fo/F, NP & M). La composición de proteínas víricas de virus NDV producido en células EBx® de pato son similares a las que se obtienen con virus NDV producido en EBx® de pollo. Además, la cinética de liberación para virus producidos en células EBx de pollo y pato son similares.

35

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

Se investigó la susceptibilidad de células EB66 de pato a la infección con sarampión utilizando virus de sarampión recombinante que expresa proteína fluorescente verde.

40

**11.1 -Métodos**

Se hacen crecer células EB66 en medio Excell en matraces T175 a 37°C bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub> 7.5% en un agitador orbital a 60 rpm. En el día 0, las células se siembran a 0.4 x 10<sup>6</sup> células/ml en 40 ml de medio fresco. El cultivo celular se incuba a 37°C, CO<sub>2</sub> 7.5% bajo agitación (60 rpm). La cinética de crecimiento celular es seguida hasta que la densidad celular ha alcanzado una concentración entre 4 x 10<sup>6</sup> a 6 x 10<sup>6</sup> células/ml (habitualmente en el día 3 posterior a la siembra). En ese punto, las células se inoculan con virus de sarampión recombinante en dos MOI diferentes (10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup> TCID<sub>50</sub>/células) y se incuban durante una hora adicional a 37°C, CO<sub>2</sub> 7.5% bajo agitación (60 rpm). Después el cultivo celular se diluye con la adición de 60 ml de medio de producción vírica fresca y la incubación continúa a 37°C y CO<sub>2</sub> 7.5% bajo agitación (60 rpm). El crecimiento celular y la cinética de producción de virus se realizan durante 7 días. Las alícuotas diarias se separan para numeración de células y titulación de virus.

45

50

**11.2 -Resultados**

55

Las células EB66 son sensibles y replican el virus de sarampión. En condiciones no optimizadas, los títulos (en TCID<sub>50</sub>/ml) de sarampión producido en células EB66 alcanza un promedio de 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/ml (figura 14).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una línea celular continua y diploide de pato derivada de embriocitoblastos que es útil para ser infectada con y replicar un virus en la que dicha línea celular de pato no produce partículas retrovirales endógenas competentes para la replicación.
- 10 2. Una línea celular continua y diploide de pato de acuerdo con la reivindicación 1 en la que dicho virus se selecciona del grupo que comprende poxvirus, ortomixovirus, paramixovirus, herpesvirus, hepadnavirus, adenovirus, parvovirus, reovirus, circovirus, coronavirus, flavivirus, togavirus, birnavirus y retrovirus.
- 15 3. Una línea celular continua y diploide de pato de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en la que dicho virus es el virus del sarampión.
4. Uso de una línea celular continua y diploide de pato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la producción de un virus que se selecciona del grupo que comprende poxvirus, ortomixovirus, paramixovirus, herpesvirus, hepadnavirus, adenovirus, parvovirus, reovirus, circovirus, coronavirus, flavivirus, togavirus, birnavirus y retrovirus.
- 20 5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4 en la que dicho virus se selecciona del grupo que consiste en virus del sarampión, virus respiratorio sincitial (VRS), virus de las paperas, virus de la rubéola, virus Sendai, virus parainfluenza humana de tipos I y III, virus de la enfermedad de Newcastle, virus Rinderpest, virus del moquillo y virus parainfluenza del pato.

Fig. 1A

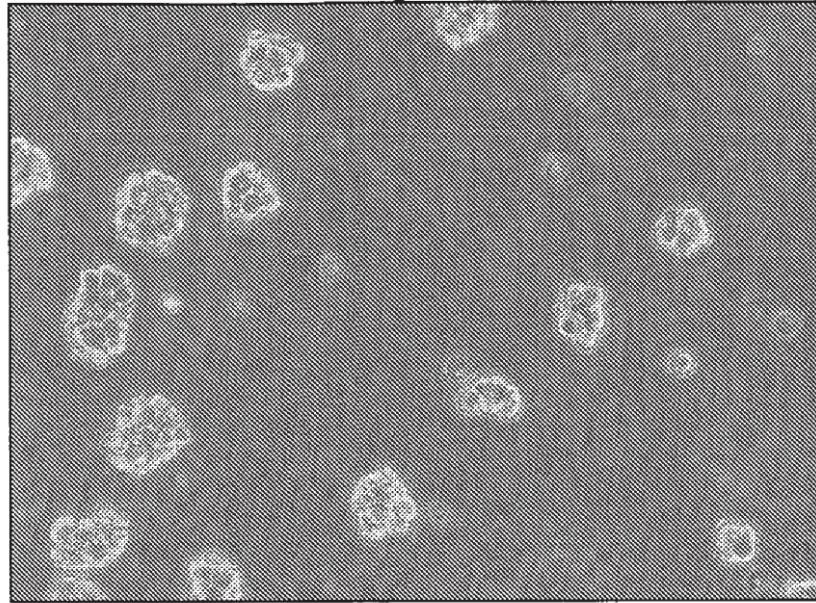
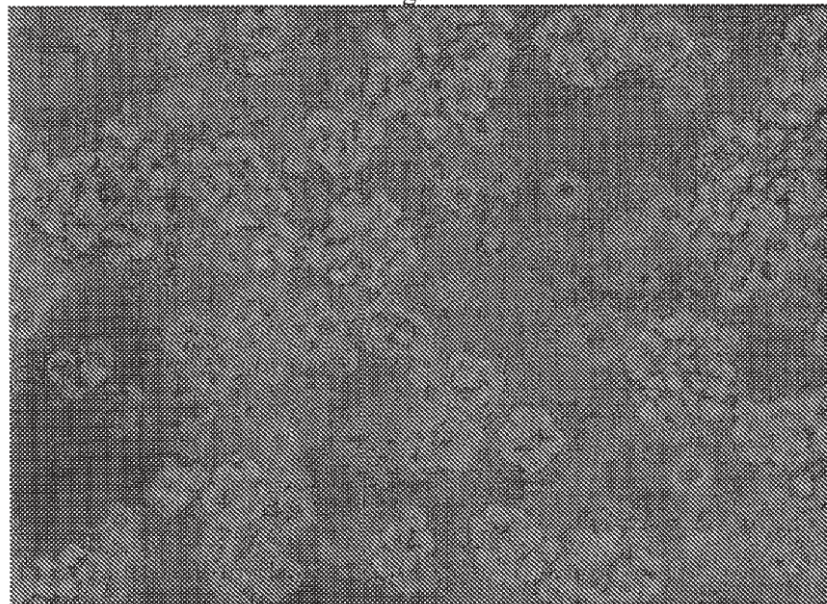
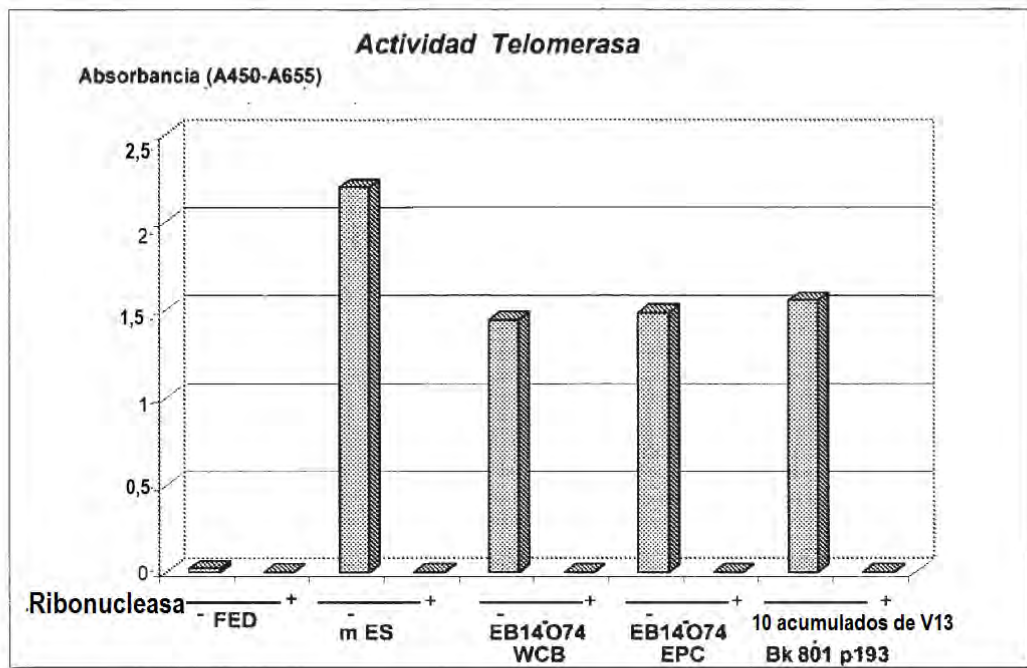


Fig.1B

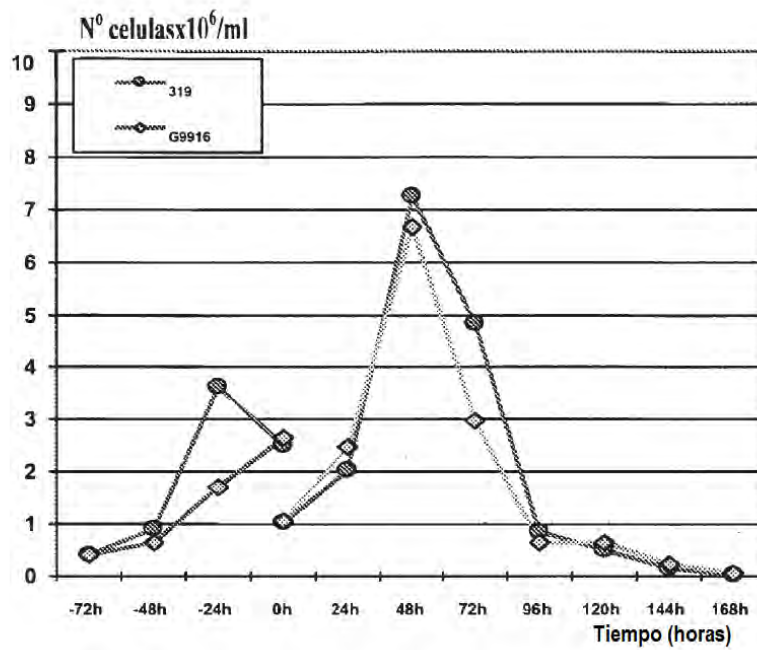


**FIGURA 1**

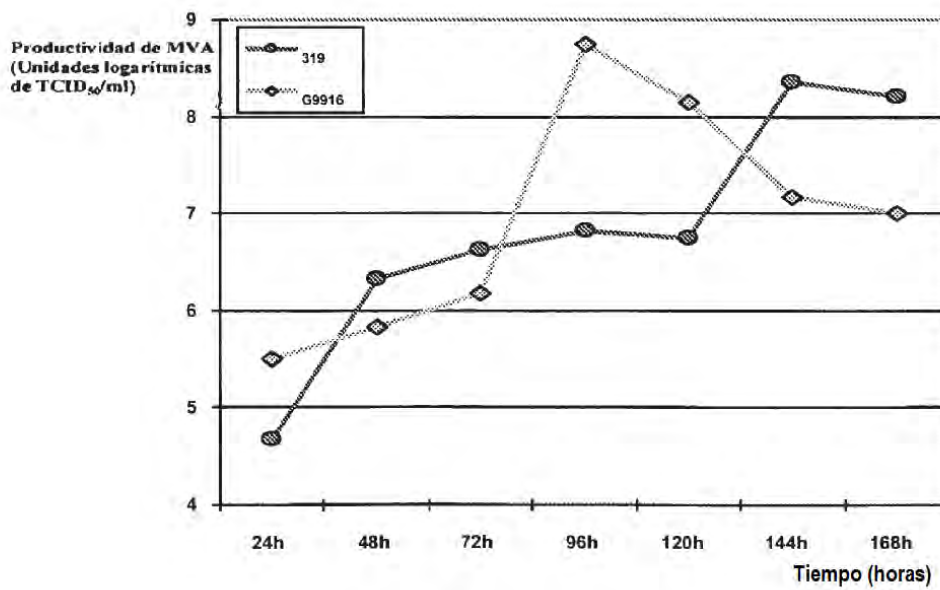


**FIGURA 2**



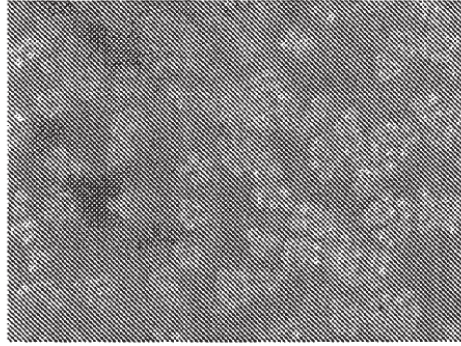


**FIGURA 3A**

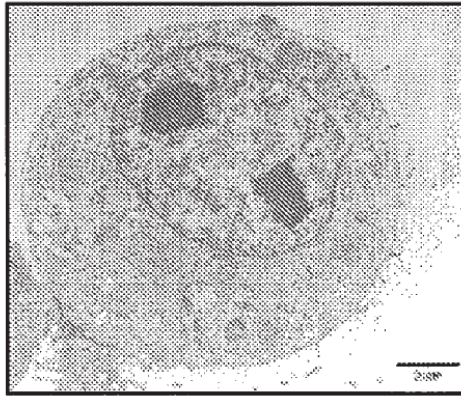


**FIGURA 3B**

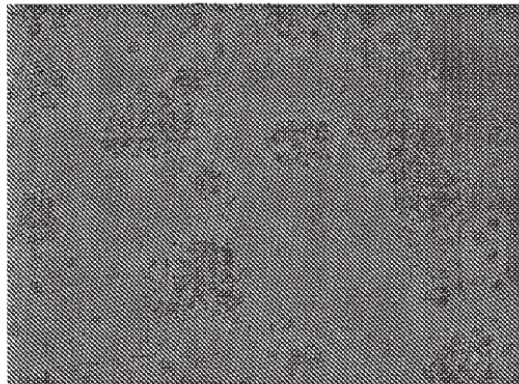
**Figura 4A**



**Figura 4B**



**Figura 4C**



**FIGURA 4**

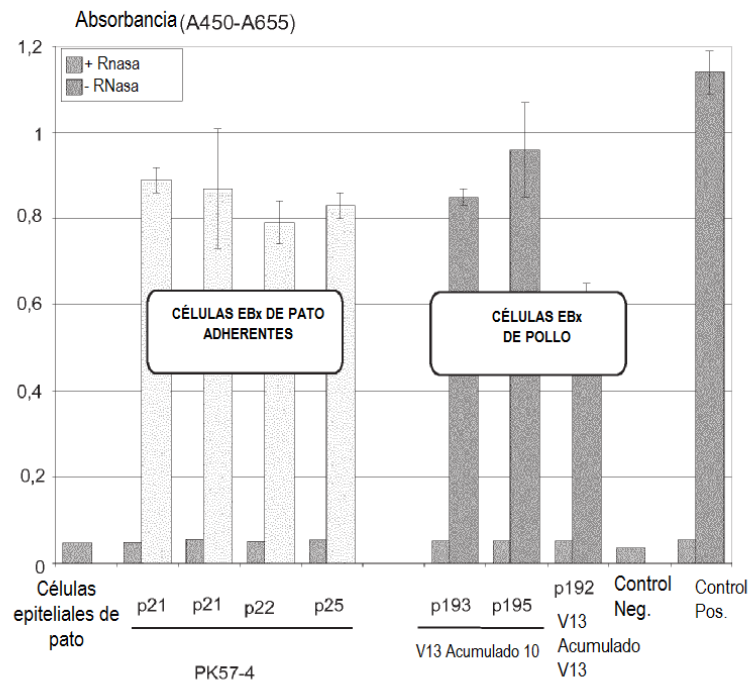


FIGURA 5A

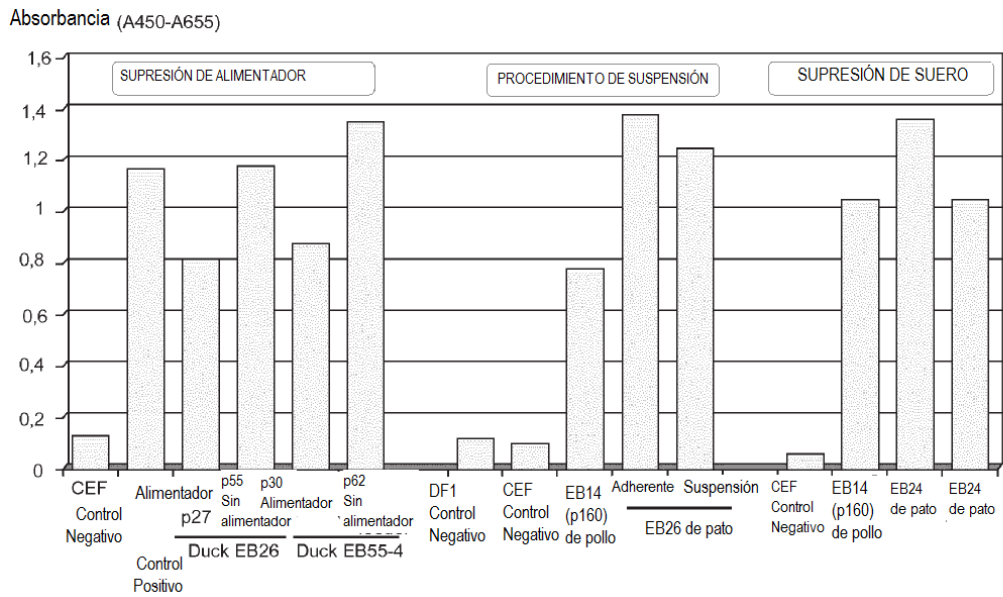


FIGURA 5B



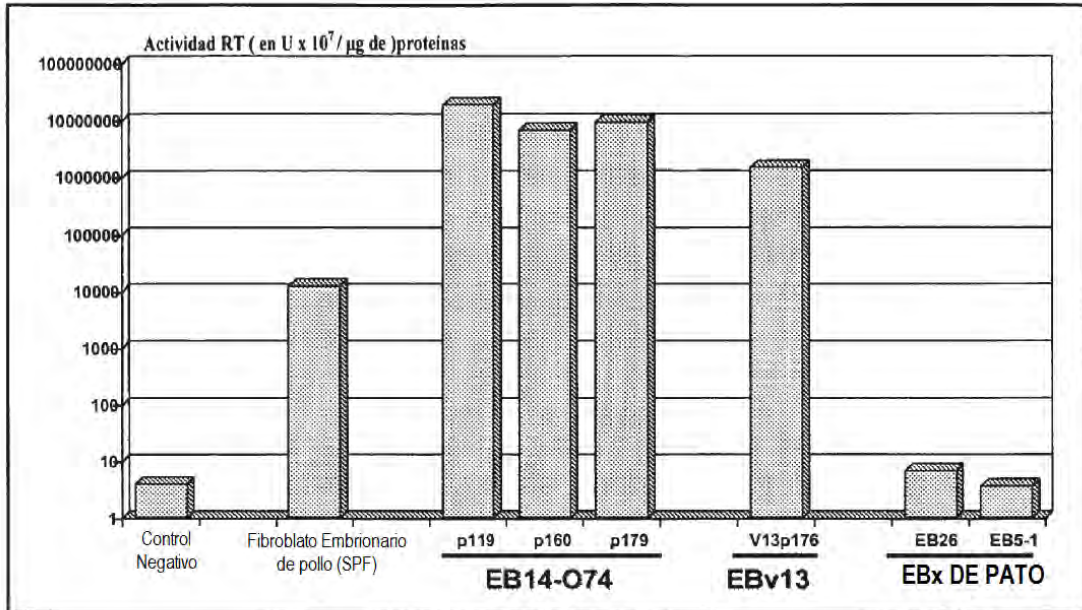


FIGURA 6A

Análisis de ELISA para p27 de ALV

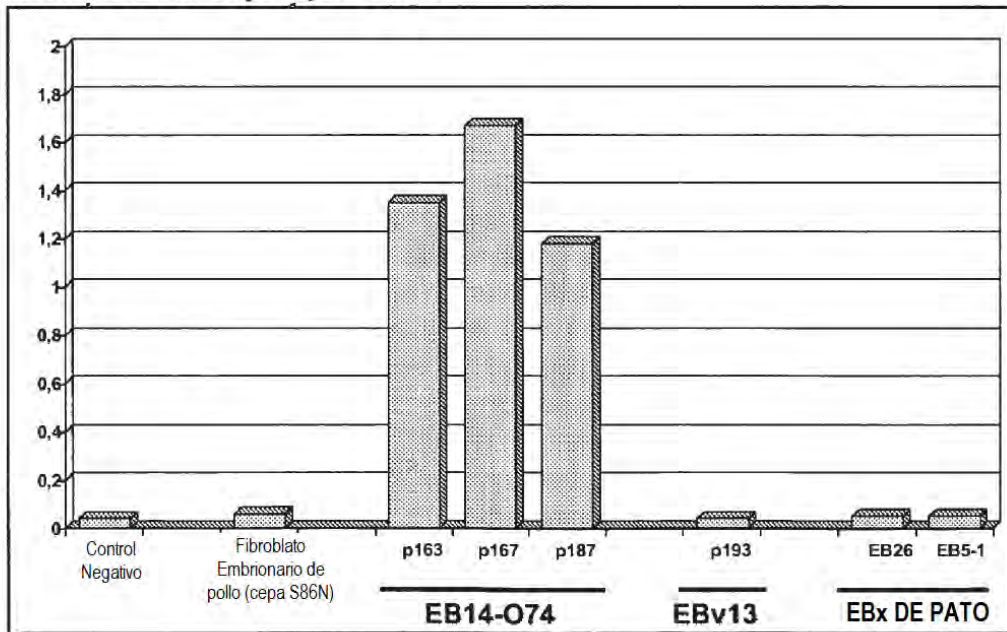


FIGURA 6B

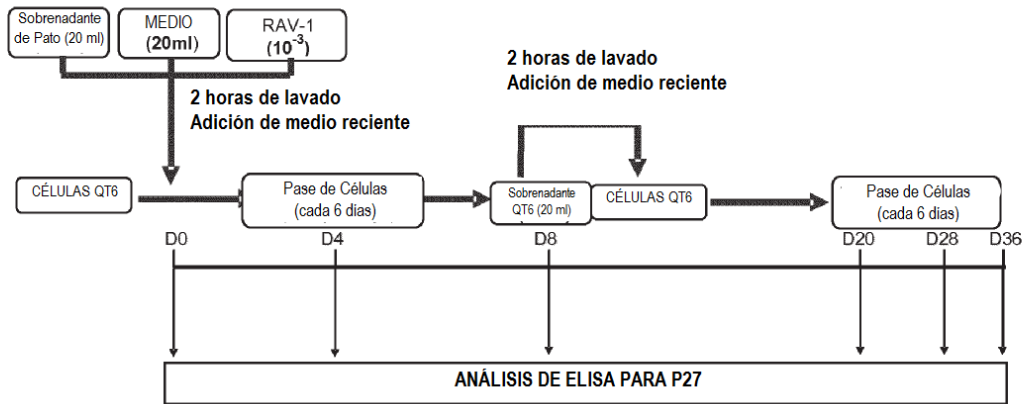


FIGURA 7A

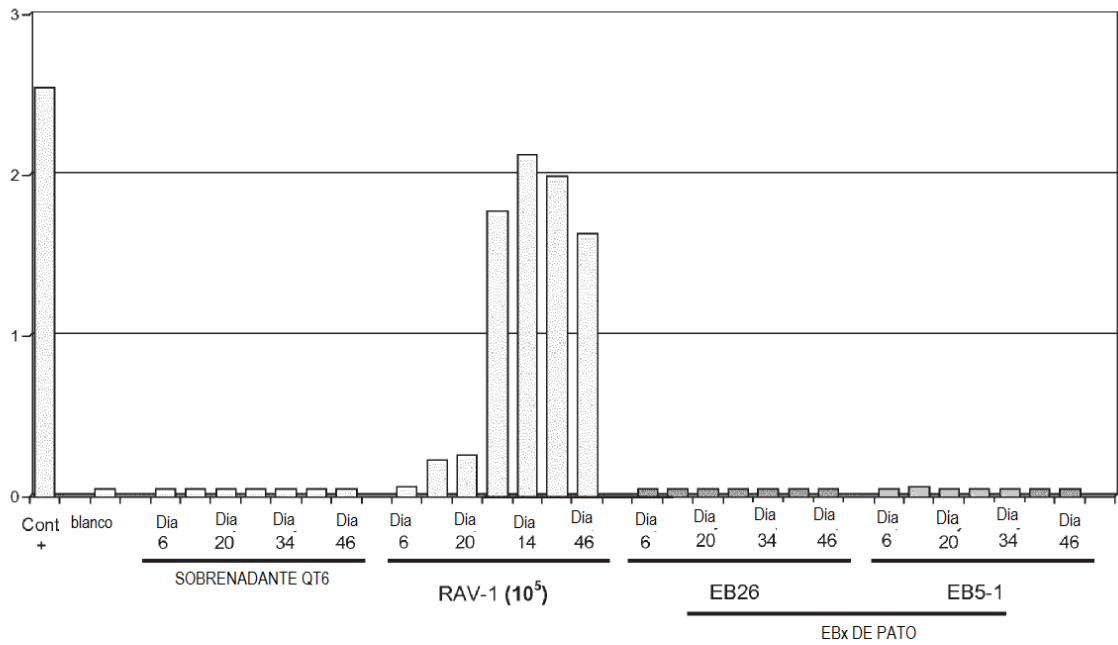


FIGURA 7B

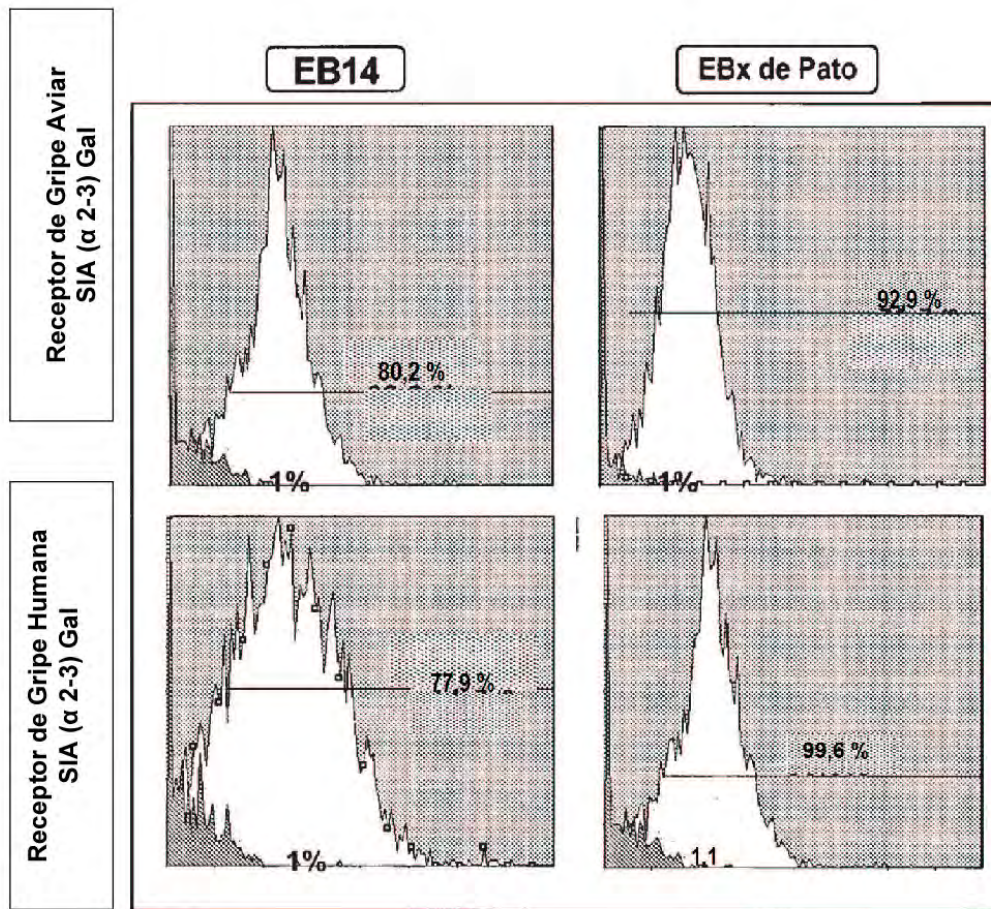


Figura 8



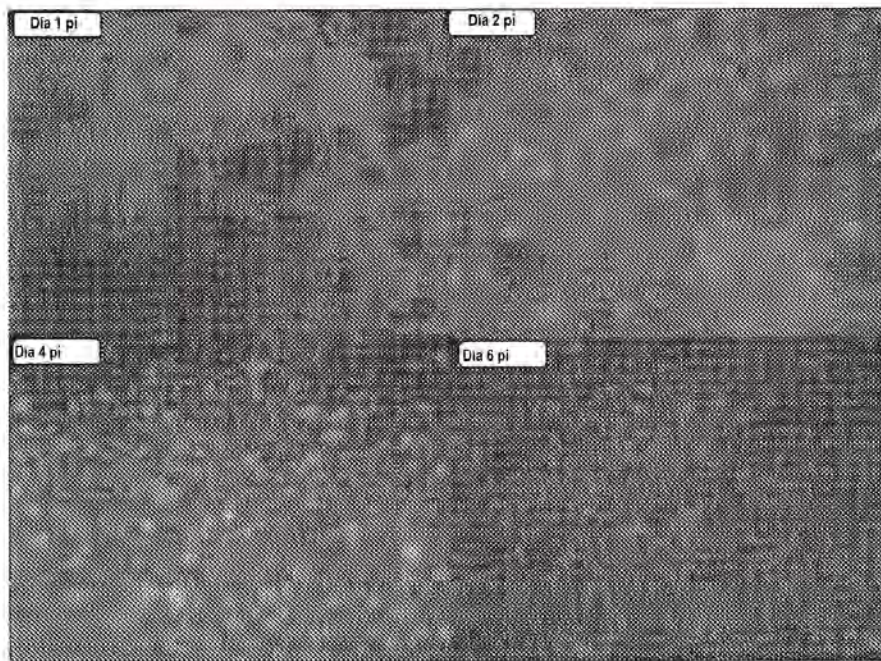


FIGURA 9A

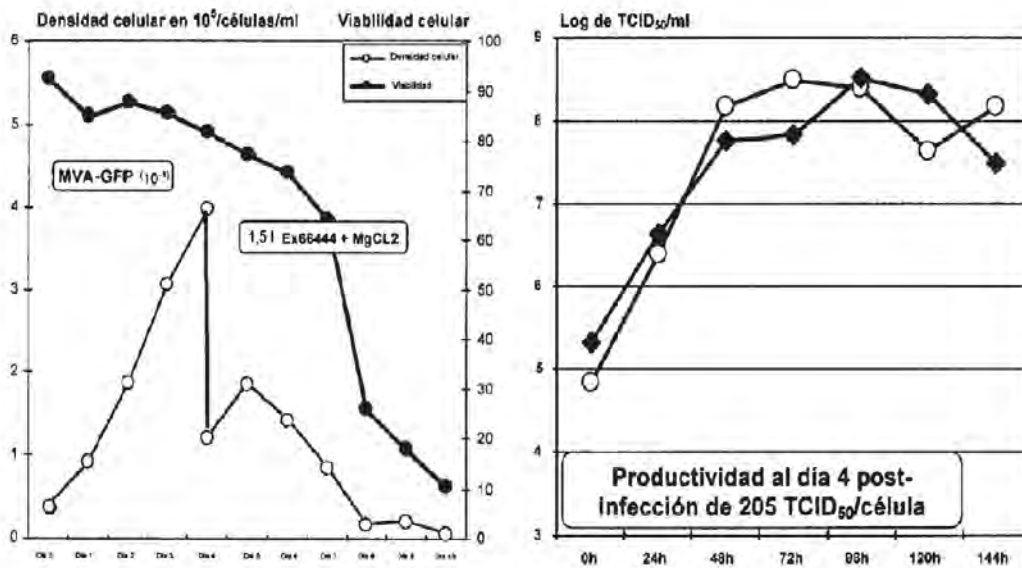


FIGURA 9B



Figura 10A

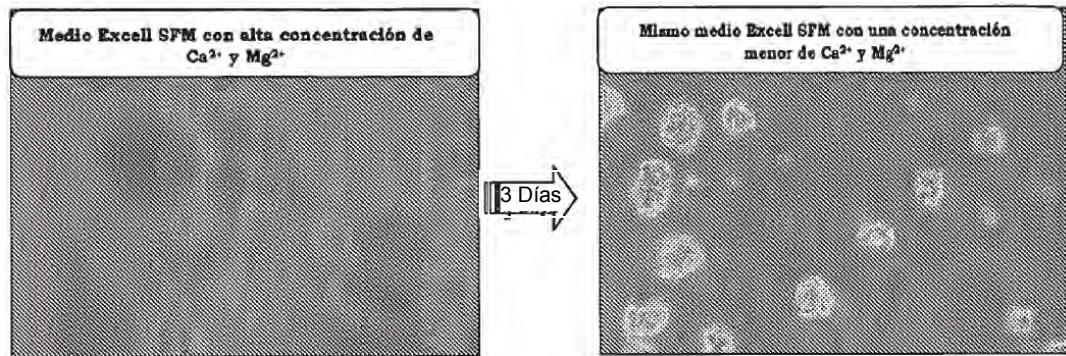


Figura 10B

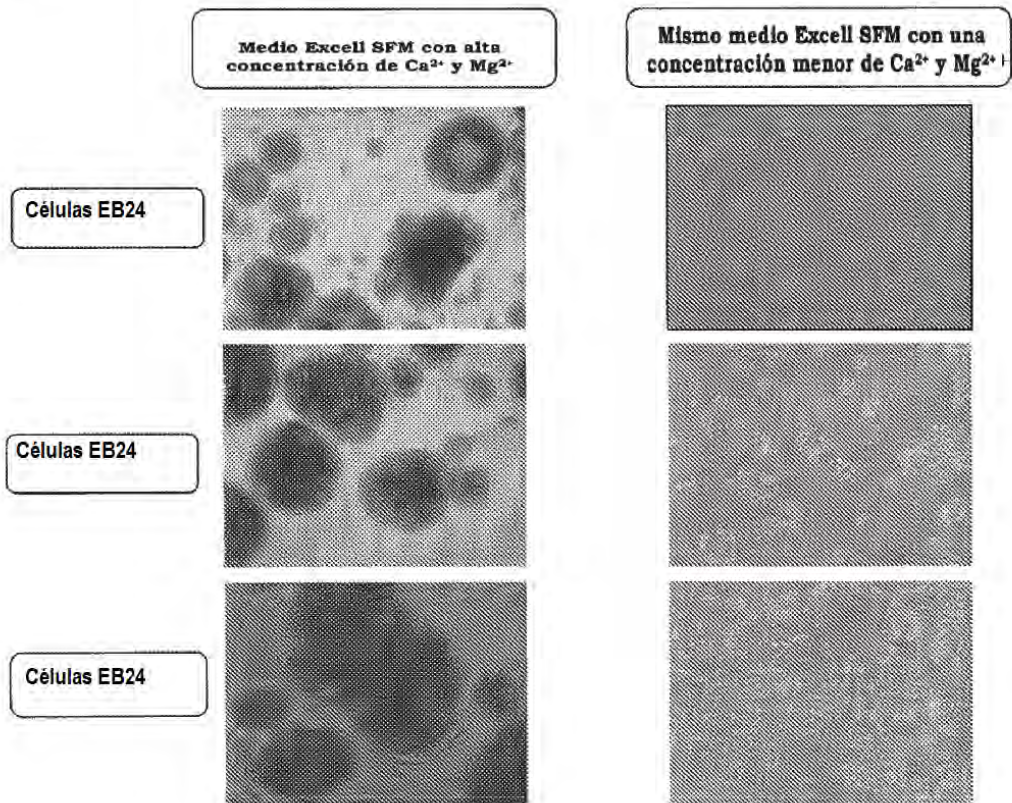


Figura 10

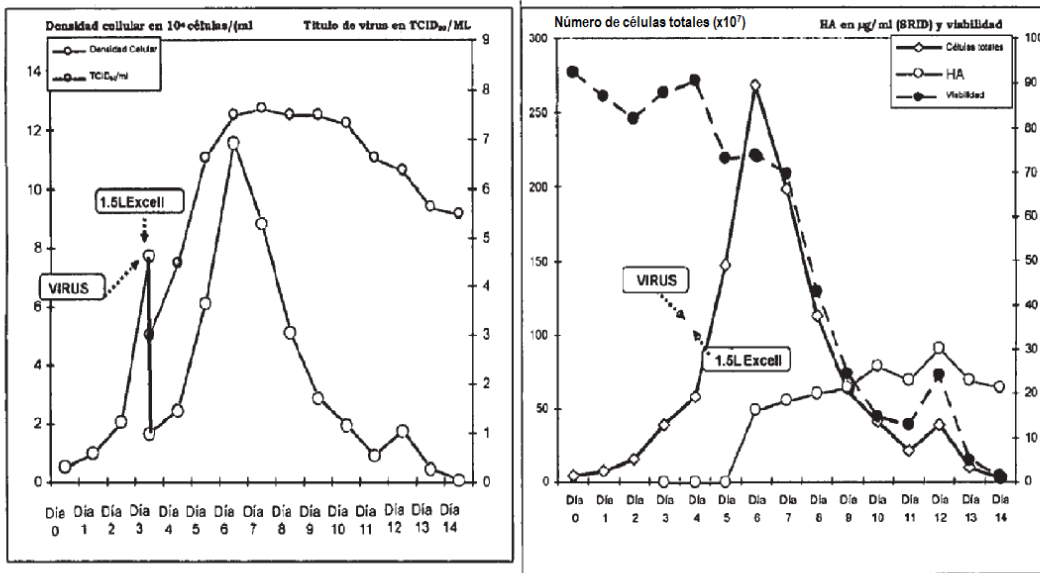


FIGURA 11A

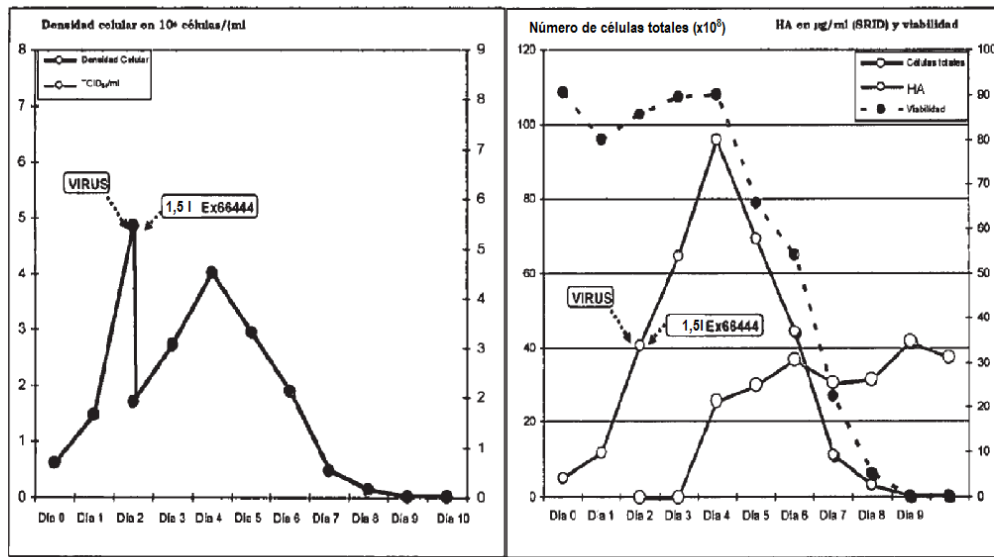


FIGURA 11B

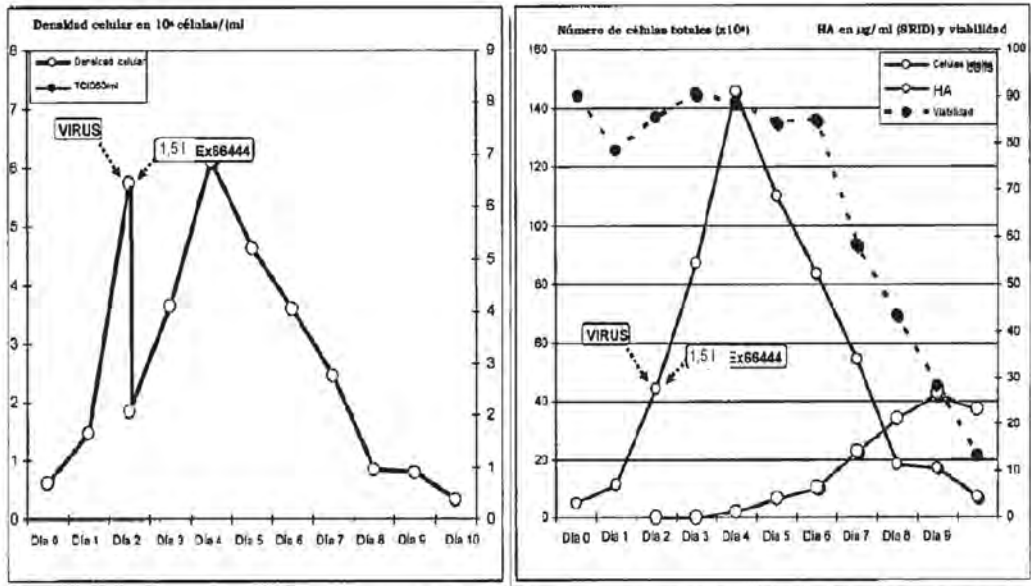


FIGURA 12

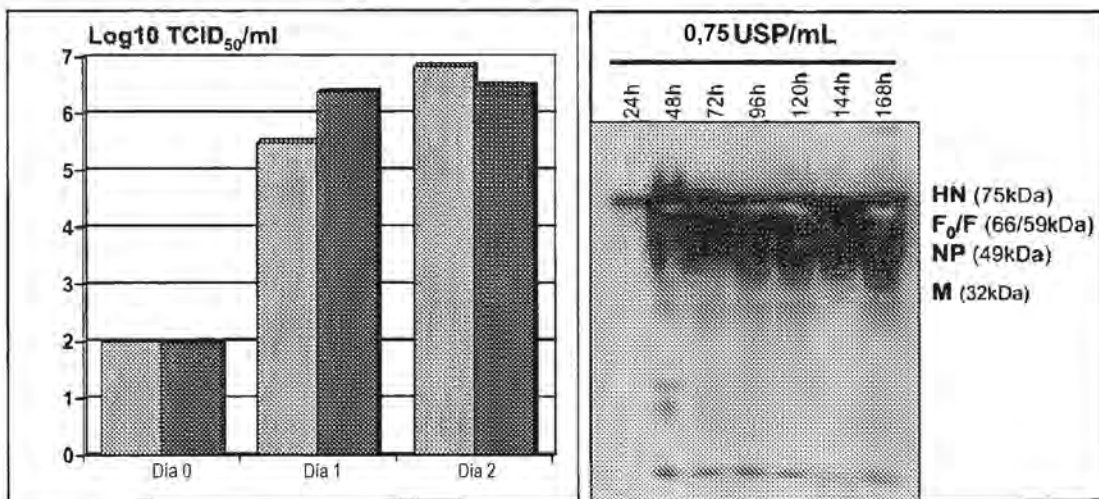


FIGURA 13

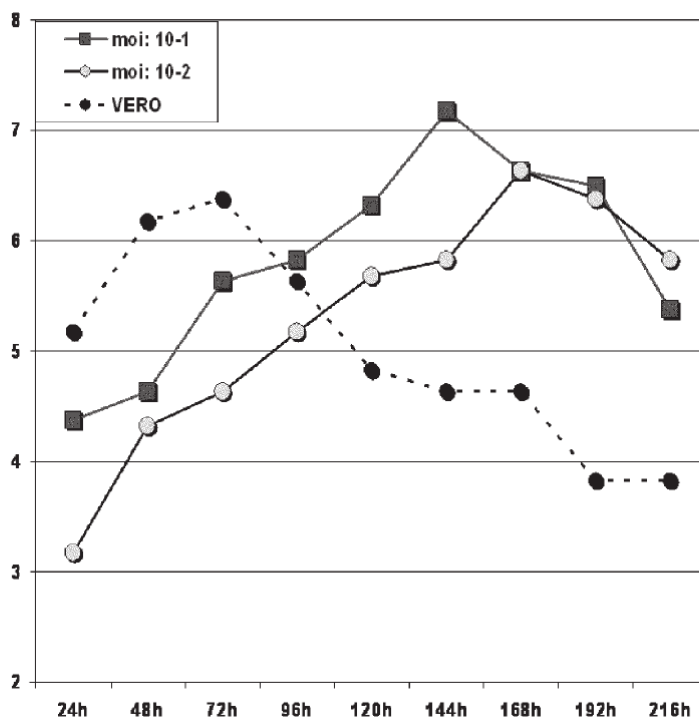


FIGURA 14

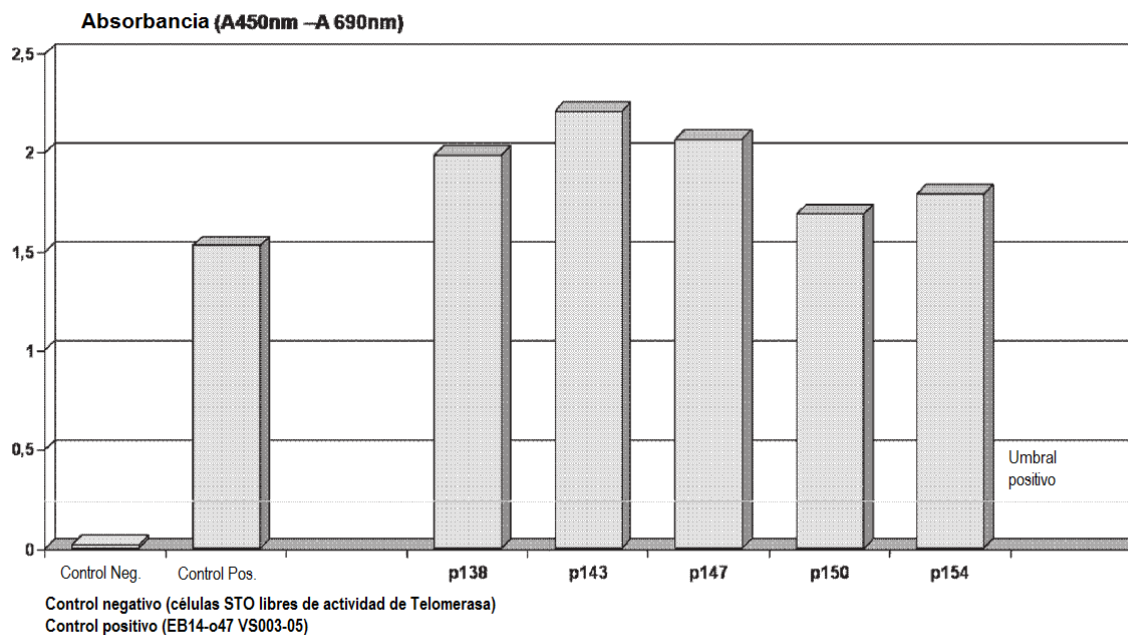


FIGURA 15A



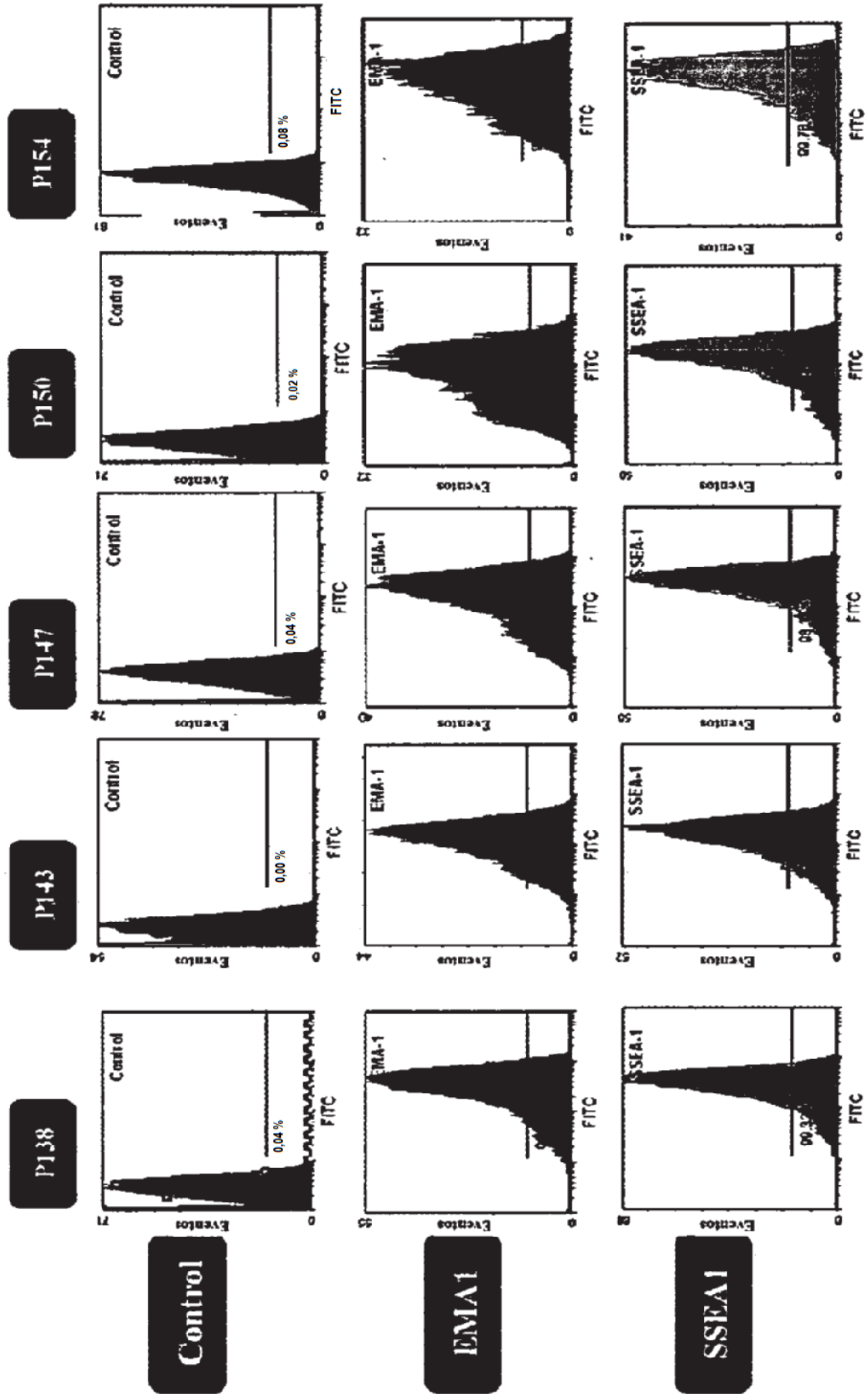


FIGURA 15B

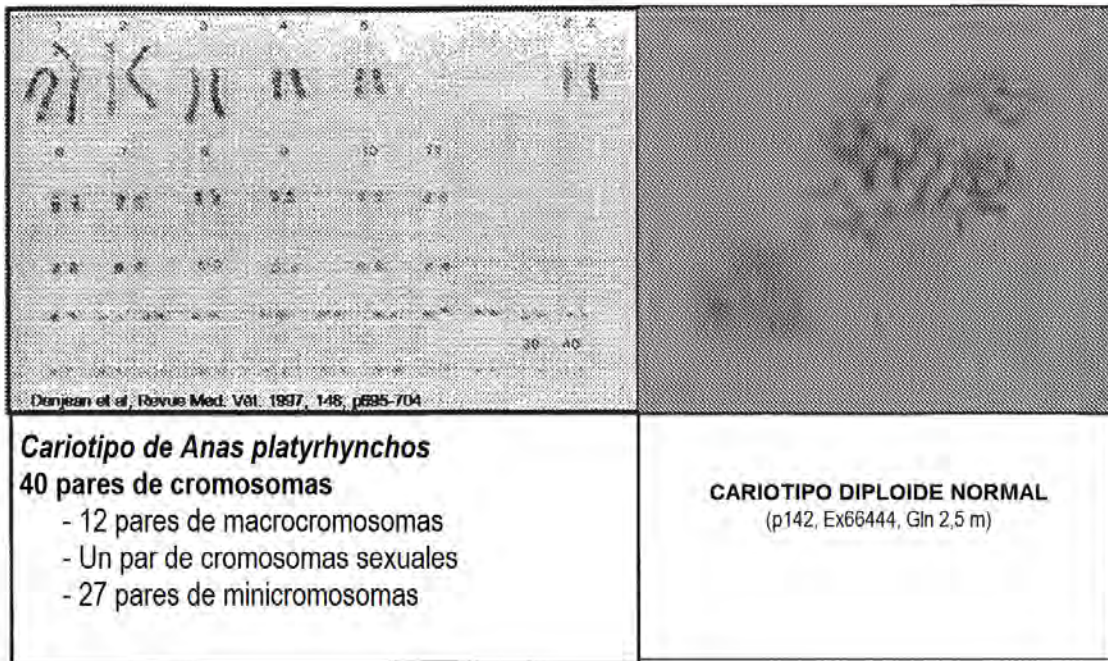


FIGURA 16