



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 200 670**

⑫ Número de solicitud: 200200255

⑮ Int. Cl.7: **C12N 5/02**
C12N 5/06

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **04.02.2002**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2004**

Fecha de la concesión: **20.01.2005**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.03.2005**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.03.2005

⑰ Titular/es: **Universidad de Málaga**
Plaza de El Ejido, s/n
29071 Málaga, ES

⑱ Inventor/es: **Álvarez Herrero, María del Camen y**
Béjar Alvarado, Julia

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Línea celular de células madre embrionarias de dorada.**

㉑ Resumen:

Línea celular de células madre embrionarias de dorada.
Se presenta una línea de células madre embrionarias (STEM) de la especie piscícola *Sparus aurata* (dorada), denominada SaBE-1c. Es una línea clonal obtenida a partir de un cultivo celular heterogéneo (SaBE-1), procedente de células embrionarias del blastodisco de la propia especie. Presenta las siguientes características típicas de células totipotentes: pequeño tamaño, forma poligonal, crecimiento en cultivo muy compacto, tiempo de duplicación de la población celular de 30 horas, cariotipo euploide estable, actividades elevadas de fosfatasa alcalina y telomerasa, capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares, capacidad de formar cuerpos embrioideos cuando se cultiva en suspensión, así como la capacidad de participar en distintos linajes celulares cuando se transplantan a un embrión receptor para producir organismos quimera. La identidad genética de esta línea se ha llevado a cabo mediante el genotipado con tres loci microsatélites.

ES 2 200 670 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Línea celular de células madre embrionarias de dorada.

Campo de la invención

La presente invención se encuadra en el sector de la biotecnología y más concretamente en el uso de los cultivos celulares en biotecnología aplicada a la acuicultura.

Estado de la técnica

Las estrategias para introducir ADN en embriones animales basadas en cultivos celulares, representan un método eficiente de obtención de variedades de animales modificados genéticamente (GMO's), ya que permiten la selección *in vitro* de eventos raros, tales como la recombinación homóloga. Estas variedades pueden ser muy valiosas, tanto por las características ventajosas que se les introducen, como por permitir estudiar la función de los genes introducidos.

Una posible aproximación para obtener animales con una modificación determinada, precisa del establecimiento de *células madre embrionarias* (células STEM), que sean capaces de contribuir a la línea germinal una vez transplantadas a embriones receptores. La tecnología de las células STEM está sirviendo además para resolver muchas cuestiones relacionadas con Biología del Desarrollo y tiene unas connotaciones muy especiales en *terapia génica humana*. Por su enorme potencial, se ha intentado el cultivo y desarrollo de este tipo de células en distintas especies animales, la mayoría de interés comercial, (revisado en Prelle y cols. 1999. Establishment of pluripotent cell lines from vertebrate species. Present status and future prospects, *Cell Tissues Organs* 165: 220-236), sin embargo esta estrategia sólo ha sido desarrollada con pleno éxito en ratón (Capecchi, 2000. How close are we to implementing gene targeting in animals other than mouse?, *Proc Natl Acad Sci* 97: 956-957).

El interés por desarrollar esta tecnología en peces es enorme, debido por un lado a las ventajas experimentales de su embriología y por otro, al interés de pequeños teleosteos, como el *pez cebra* y el *pez medaka* como especies modelo para estudiar el desarrollo en vertebrados. Los intentos para obtener *células madre embrionarias* en peces, sólo han tenido un éxito parcial en *pez cebra* (Collodi y cols., 1992 Fish embryo cell cultures for derivation of stem cells and transgenic chimeras. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1: 257-265; Sun y cols., 1995a ES-like cell cultures derived from early zebrafish embryos. *Mol Mar Biol Biotechnol* 4: 193-199 and b Feeder cell cultures for zebrafish embryonal cells *in vitro*. *Mol Mar Biol Biotechnol* 4: 43-50; Ma y cols., 2001 Production of zebrafish germ-line chimeras from embryo cell cultures. *Proc Natl Acad Sci* 98: 2461-2466). Sin embargo, en *pez medaka* se ha logrado una línea celular con características de las células madre, que ha demostrado ser altamente eficiente en la producción de quimeras (Hong y Scharl, 1996 Establishment and growth responses of early medakafish (*Oryzias latipes*) embryonic cells in feeder layer-free cultures. *Mol Mar Biol Biotechnol* 5: 93-104; Hong, Winkler y Scharl, 1996 Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medaka fish (*Oryzias latipes*). *Mech of Dev* 60:33-44; Hong, Winkler y Scharl, 1998 Production of medakafish chimeras from a stable embryonic cell line *Proc Natl Acad Sci* 95: 3679-3684).

Los recientes avances en la transgenia en peces, que han permitido la obtención de construcciones con mejores niveles de integración y de expresión (revisado en Hackett y Alvarez, 2000 The Molecular genetics of transgenic fish. En M. Fingerhman y R. Nagabhushanam eds. *Recent Advances in Marine Biotechnology*, vol 4 Science Publisher, Inc. Enfield, USA), han añadido un nuevo atractivo al desarrollo de líneas de células madre embrionarias de especies piscícolas, no sólo en especies modelo, sino también en especies de interés comercial, con el objetivo de mejorar genéticamente los caracteres relacionados con la producción en acuicultura. Un ejemplo ilustrativo lo ofrece la dorada, una especie de pez marino que se ha convertido en una de las más importantes en la acuicultura europea y que además parece ser un buen modelo para la domesticación de especies relacionadas. Existe por tanto un enorme interés en abordar todas las estrategias posibles para mejorar su productividad.

Explicación de la invención

La presente invención desarrolla una línea celular de células madre embrionarias de dorada, denominada SaBE1-c.

La línea SaBE1-c ha sido caracterizada para todos los rasgos posibles de pluripotencia. No necesita para su cultivo de células nodriza, presenta un crecimiento en monocapa y ningún síntoma de inestabilidad, envejecimiento o diferenciación espontánea a lo largo de 50 pases y 9 meses de cultivo, pudiendo ser

congelada sin perder ninguna de sus características iniciales.

La línea SaBE-1c posee todas las características *in vitro* descritas para este tipo de células, siendo las siguientes las más relevantes:

- la *morfología* celular, típica de las células madre embrionarias: tamaño pequeño, forma poligonal y crecimiento compacto en cultivo.
- su *cariotipo* es euploide estable.
- su intensa *actividad fosfatasa alcalina*.
- su *actividad telomerasa*.
- su capacidad de formar *cuerpos embrioideos* cuando se cultiva en suspensión.
- su capacidad de diferenciarse hacia distintos *tipos celulares* cuando se cultiva en presencia de ácido retinoico.
- su capacidad de producir organismos *quimera*, donde contribuyen a la formación de distintos linajes celulares.

También se ha caracterizado mediante marcadores moleculares tipo microsatélites. Su genotipo para los loci SA 26, SA 32 y SA 41b, es el siguiente: SA 26: 225/250; SA 32: 148/174 y SA 41b: 152/172.

El procedimiento de obtención de esta línea celular de células madre embrionarias de dorada, utilizado en la presente invención, consta de las siguientes fases:

- Mediante la aplicación de las condiciones adecuadas para el inicio y mantenimiento en cultivo de este tipo de células (ver Béjar, Hong y Alvarez 1999. Towards obtaining ES cells in the marine fish species Sparus aurata; multipassage maintenance, characterisation and transfection. *Genet Anal: Biomol Engin* 15: 125-129.), se obtuvo un cultivo heterogéneo de células embrionarias de dorada. Para los cultivos primarios se emplearon entre 50 y 70 embriones en cada lote. El cultivo resultante se denominó SaBE-1, el cual no podía ser considerado una línea celular genéticamente homogénea, al no proceder de un sólo individuo.
- A partir del cultivo celular SaBE-1, se derivó una línea clonal que garantiza la similitud genética de todas las células, denominada línea celular clonal SaBE-1c de células madre embrionarias de dorada. El proceso seguido fué el siguiente:
- Células del cultivo SaBE-1 se sembraron en placas de cultivo, a una densidad que permitiera la formación de colonias independientes o clones de células.
- Durante los días siguientes se controló la formación y crecimiento de estas colonias al microscopio. Una vez que las colonias alcanzaron un tamaño apropiado, se escogieron varias de entre las que presentaban una morfología óptima.
- Se tomaron células de cada uno de estos clones y se sembraron en pocillos independientes, donde las células crecieron hasta la confluencia.
- De entre los distintos clones se escogió aquel que presentaba mejores condiciones en cuanto a morfología y crecimiento, procediendo a continuación a su caracterización.
- Una vez comprobado que el clon seleccionado poseía todas las características de las células madre embrionarias y una vez demostrada su naturaleza clonal mediante la aplicación de tres loci de microsatélites, confirmamos la obtención de una línea celular clonal de células madre embrionarias de dorada a la que denominamos SaBE-1c.

Explicación de las figuras

Figura 1: Células SaBE-1c a los 40 pases. Se aprecia la morfología típica de las células madre embrionarias: pequeño tamaño, forma poligonal y cultivo de aspecto compacto.

Figura 2: Curva de crecimiento de las células SaBE-1c. Eje de abcisas: días desde que se inició el cultivo. Eje de ordenadas: número de células alcanzado.

Figura 3: Distribución del número de cromosomas de las células SaBE-1c en el pase 60. El número de metafases analizadas es 64. Eje de abscisas: número de cromosomas observados en las metafases. Eje de ordenadas: frecuencia de con que se observó cada número de cromosomas.

Figura 4: Metafase euploide de la línea SaBE-1c. La barra equivale a 10 μm .

Figura 5: Actividad fosfatasa alcalina de las células SaBE-1c. 100x

Figura 6: Capacidad de diferenciación de las células SaBE-1c *in vitro*: a) Célula similar a una neurona; b) Célula con forma estrellada; c) Células musculares y d) Cuerpo embrioideo. A, B y C = 200x; D = 70x.

Figura 7: Quimeras de dorada obtenidas inyectando células de la línea SaBE-1c en embriones en estado de blástula. A y B: Embrión justo después de la inyección de las células. Se puede observar un grupo de células fluorescentes dentro del blastodisco. C y D: Embrión de 24 horas que presenta una célula fluorescente en el tejido extraembrionario. E y F: Embrión de 24 horas donde se aprecia un grupo de células fluorescentes formando una vena. G y H: Embrión de 30 horas en el que aparece un grupo de células fluorescentes en la vesícula ótica. A, C, E y G son fotografías en campo oscuro. B, D, F y H son fotografías en campo claro. La barra equivale a 100 μm .

Descripción detallada de la invención

A continuación se describe detalladamente el procedimiento seguido para la obtención de la línea celular de células madre embrionarias de dorada, denominada SaBE-1c, y la comprobación de que efectivamente se trataba de una línea clonal, debiendo considerarse esta descripción detallada como un modo de realización preferente y no excluyente de la invención.

La línea clonal SaBE-1c se ha obtenido a partir del cultivo celular SaBE-1. Este cultivo celular ha sido desarrollado en nuestro laboratorio a partir de células procedentes de embriones en estado de media blástula (alrededor de 1000 células), según se describe en Béjar, Hong y Alvarez 1999. Towards obtaining ES cells in the marine fish species *Sparus aurata*; multipassage maintenance, characterisation and transfection. *Genet Anal: Biomol Engin* 15: 125-129. Este cultivo había demostrado su estabilidad y presentaba todas las características *in vitro* descritas para las células madre embrionarias. Sin embargo la obtención de una línea clonal a partir de este cultivo estable, es un requisito muy importante a la hora de utilizar más adelante estas células, sobre todo para la formación de quimeras, puesto que la heterogeneidad del cultivo SaBE-1 no garantiza las condiciones requeridas para la aplicación de la tecnología de las células madre embrionarias.

Cuando este cultivo se encontraba en el pase número 30, las células se sembraron a una densidad muy baja, de manera que fuera posible la obtención de colonias o clones independientes de células. En nuestro caso las células se sembraron en placas de cultivo de 10 centímetros de diámetro a una densidad de 50 células por mililitro. Durante los días siguientes se vigiló a través del microscopio el crecimiento de las células aisladas y la formación paulatina de las colonias.

A las dos o tres semanas de crecimiento en estas condiciones, se observó la presencia en las placas de varios clones con la morfología adecuada. Se escogieron 10 de entre los que presentaban mejor aspecto y se recogieron entre 100 y 300 células de cada uno. Estas células se sembraron en pocillos independientes en una placa de 24 pocillos. De nuevo se vigiló cuidadosamente la morfología y el crecimiento de los clones ya separados. Una vez obtenidos cultivos estables a partir de estos clones, se escogió uno de ellos en base a su morfología y crecimiento y se procedió a su caracterización, lo cual dio lugar a la confirmación de que se había obtenido una línea celular clonal de células madre embrionarias de dorada a la que denominamos SaBE-1c.

Estas células crecen en monocapa y presentan la morfología típica de las células madre embrionarias, como son pequeño tamaño, forma poligonal y crecimiento compacto en cultivo. Todas estas características pueden apreciarse en la figura 1. Esta línea se ha cultivado hasta más de 60 pases sin signos aparentes de inestabilidad ni de diferenciación espontánea, sugiriendo así una capacidad de proliferación indefinida.

El modelo de crecimiento de estas células se presenta en la figura 2. La densidad máxima de células se alcanza el séptimo día y el tiempo que tarda en duplicarse la población celular es de 30 horas.

La estabilidad cromosómica es uno de los requisitos imprescindibles en este tipo de células. Para comprobar la distribución del número de cromosomas que presentaba la línea celular, se obtuvieron metafases de esta línea en el pase 60 según el procedimiento ya descrito en Alvarez, Otis, Amores y Guise,

1991. Short-term cell culture technique for obtaining chromosomes in marine and freshwater fish. *J of Fish Biol* 39: 817-824, y usado en nuestro laboratorio de forma rutinaria. Como se aprecia en la figura 3, la distribución presenta un número modal de 48 cromosomas que se corresponde con el número diploide descrito para esta especie (Sola y Cataudella, 1978. Prime osservazioni Sulla cariologia degli sparidi Mediterranei. *Boll Zool* 45: 242). Así mismo, los cromosomas presentan la morfología propia descrita por estos mismos autores para la dorada. En la figura 4 se presenta una metafase de las utilizadas para la distribución de la Figura 3 donde se pueden apreciar estas características. Las metafases que presentan números cromosómicos por encima y por debajo del valor modal se deben o a una segregación incorrecta de los cromosomas, lo cual puede ocurrir en pequeña medida en condiciones de cultivo, o ser artefactos inherentes a la técnica, los cuales son mucho más frecuentes. Por lo tanto el perfil obtenido para la línea SaBE-1c, indica que la línea es euploide y cromosómicamente estable.

Con el objeto de confirmar la naturaleza clonal de la línea SaBE-1c se le aplicaron tres loci de ADN microsatélite que poseen una variabilidad muy alta. Los resultados obtenidos son los siguientes: para el locus SA26: 225/250, para el SA32: 148/174 y para el SA 41b: 152/172. Con la asignación de estos marcadores genéticos es posible identificar en lo sucesivo a la línea SaBE-1c y queda demostrada su naturaleza clonal.

Entre los distintos tests que se utilizan para demostrar la pluripotencia de las células madre embrionarias, la presencia de actividad fosfatasa alcalina es uno de los más comunes. Para detectar esta actividad en la línea SaBE-1c, se siguió el procedimiento descrito por Hong y Scharl, 1996. Establishment and growth responses of early medakafish (*Oryzias latipes*) embryonic cells in feeder layer-free cultures. *Mol Mar Biol Biotechnol* 5: 93-104. En la figura 4 se presentan los resultados obtenidos, donde puede apreciarse claramente la intensa unión de las células después del tratamiento.

Otro marcador interesante a la hora de evaluar la calidad de las células madre embrionarias, es la presencia de actividad telomerasa. En este caso se siguió el procedimiento descrito por Piatyscek, Kim, Weinrich, Hiyama, Wright y Shay, 1995. Detection of telomerase activity in human cells and tumors by a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) *Methods Cell Sci* 17: 1-15. En la tabla 1 se presentan los resultados en unidades de absorbancia.

TABLA 1

Actividad telomerasa en varios tipos celulares de dorada: Control positivo: línea humana inmortalizada, WAC-2. Blastómeros obtenidos a partir de embriones en media blástula. SaBE-1 (pase 30), es la línea parental de SaBE-1c. SaBE-1c es la línea clonal en el pase 40. El control negativo son las mismas células tratadas con RNAsa

Muestra	Control +	Control -	Blastómeros	Blastómeros control-	SaBE-1 30 p	SaBE-1 control -	SaBE-1c 40 p	SaBE-1c control -
Absorbancia	0,924	0,088	1,161	0,081	0,810	0,078	0,958	0,089

Puede observarse como el valor obtenido por la línea SaBE-1c es comparable al del control positivo, al que presentan los blastocitos procedentes de media blástula y al del cultivo SaBE-1 del que procede. Por tanto la línea SaBE-1c tiene un nivel de actividad telomerasa que no ha disminuido durante el periodo de cultivo. Al estar este marcador estrechamente asociado a la capacidad de proliferar indefinidamente de las células, podemos asociar esta característica a la línea SaBE-1c.

Otro test importante a la hora de confirmar la pluripotencia de una línea celular, es demostrar su capacidad de diferenciarse *in vitro*, cuando se cultivan en condiciones específicas inductoras de procesos de diferenciación. En nuestro caso utilizamos el protocolo descrito por Hong, Winkler y Scharl, 1996 Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medaka fish (*Oryzias latipes*). *Mech of Dev* 60:33-44, en el que se utiliza ácido retinoico como agente inductor de la diferenciación. Efectivamente, después de tratar las células con este agente, se pudieron observar en los cultivos distintos tipos celulares, algunos de los cuales se presentan en la figura 6. La demostración por parte de la línea SaBE-1c de su capacidad de diferenciarse *in vitro* refuerza aún más su carácter pluripotente.

Así mismo cuando las células de la línea SaBE-1c se sembraron en placas de cultivo bacteriano, es decir, no tratadas para permitir la adhesión de células, se pudo detectar la formación de agregados celulares que se corresponden con los cuerpos embrioideos descritos en ratón y utilizados en esta especie como otra característica típica de las células madre embrionarias (Robertson, 1987. Embryo-derived stem cell

lines. *En Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A practical approach*. Robertson EJ, ed. IRL Press Oxford pp: 71-112.). En la figura 6 se presenta uno de estos agregados celulares obtenidos a partir de las células de la línea SaBE-1c.

5 Para demostrar la pluripotencia de las células SaBE-1c *in vivo*, se inyectaron estas células en embriones en estado de blástula, es decir, se produjeron organismos quimera siguiendo el procedimiento desarrollado por Hong, Winkler y Scharl, 1998. Production of medakafish chimeras from a stable embryonic cell line *Proc Natl Acad Sci* 95: 3679-3684. Para poder detectar las células inyectadas, éstas se transfectaron previamente con un plásmido que contiene el gen de la proteína verde fluorescente y un gen
10 de resistencia a gentamicina que permite la selección de las células transfectadas. Una vez seleccionadas las células positivas, se introdujeron en los embriones receptores, donde de nuevo las células de la línea celular SaBE-1c demostraron su carácter pluripotente al ser capaces de sobrevivir, proliferar y contribuir a diferentes linajes dentro del embrión receptor. En la figura 7 se presentan algunas de las quimeras obtenidas.

15 Por lo tanto las células SaBE-1c demostraron poseer todas las características *in vitro* necesarias como para ser catalogadas como células pluripotentes, es decir células madre embrionarias. Así mismo demostraron su pluripotencia también *in vivo*, lo que las convierte en equivalentes a otras líneas de células madre embrionarias desarrolladas en otras especies, con el valor añadido de provenir de una especie de
20 peces de alto interés económico en acuicultura.

REIVINDICACIONES

1. Línea celular de células madre embrionarias de dorada, denominada SaBE-1c, obtenida como línea clonal derivada de un cultivo heterogéneo de células embrionarias de dorada SaBE-1, **caracterizada** porque:

- *in vitro* (i) se cultiva sin capa de células nodriza, (ii) presenta un crecimiento en monocapa y ningún síntoma de inestabilidad, envejecimiento o diferenciación espontánea durante cultivos prolongados (más de 60 pases y más de 9 meses de cultivo), y (iii) puede ser congelada sin perder ninguna de sus características iniciales;
- la morfología de las células es típica de las células madre embrionarias, presentando tamaño pequeño, forma poligonal y crecimiento compacto en cultivo;
- su cariotipo euploide es estable;
- su actividad fosfatasa alcalina es intensa;
- presenta actividad telomerasa;
- tiene capacidad de diferenciarse hacia distintos tipos celulares cuando se cultiva en presencia de ácido retinoico;
- tiene capacidad de formar cuerpos embrioideos cuando se cultiva en suspensión;
- tiene capacidad de producir organismos quimera, contribuyendo a la formación de distintos linajes celulares, y
- su genotipo para los loci de microsatélites SA 26, SA 32 y SA 41b es el siguiente:
 - SA 26: 225/250
 - SA 32: 148/174
 - SA 41b: 152/172.

2. Uso de la línea celular de células madre embrionarias de dorada, según reivindicación 1, en procedimientos de obtención de animales modificados genéticamente.

3. Uso de la línea celular de células madre embrionarias de dorada, según reivindicación 1, en estudios sobre la biología del desarrollo de dorada.

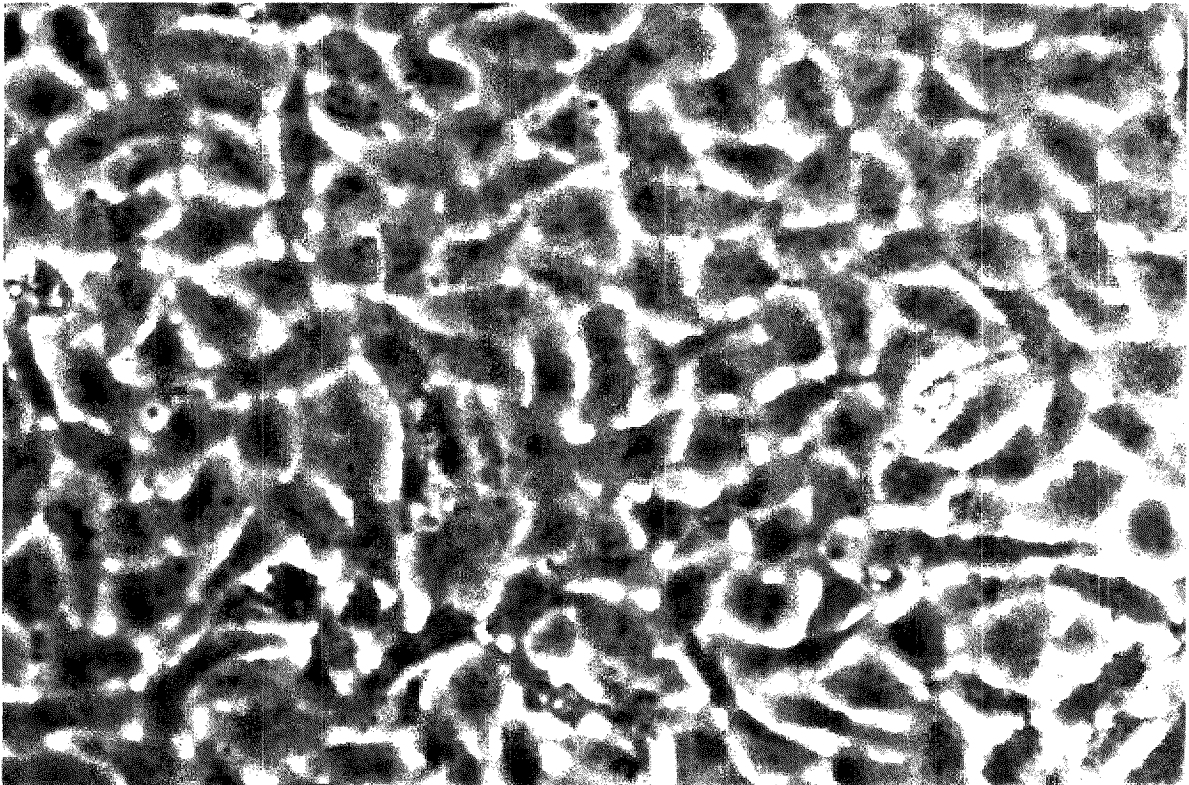


FIGURA 1

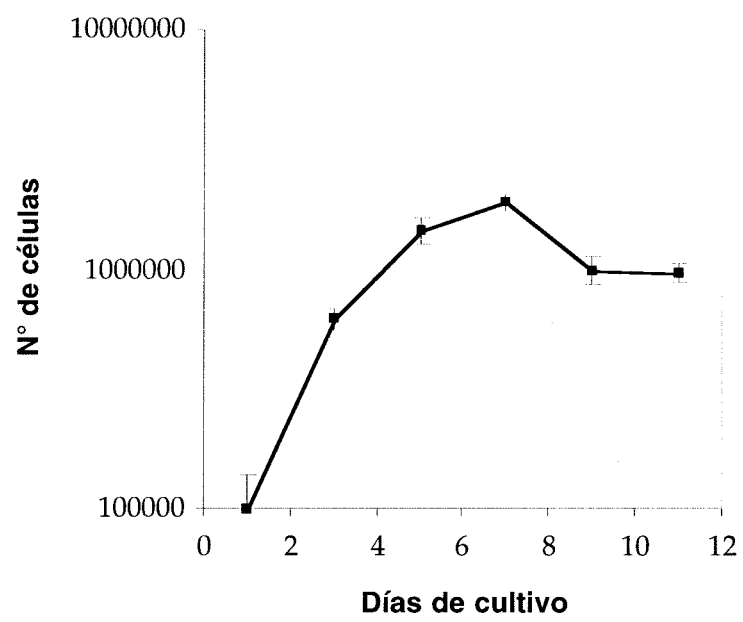


FIGURA 2

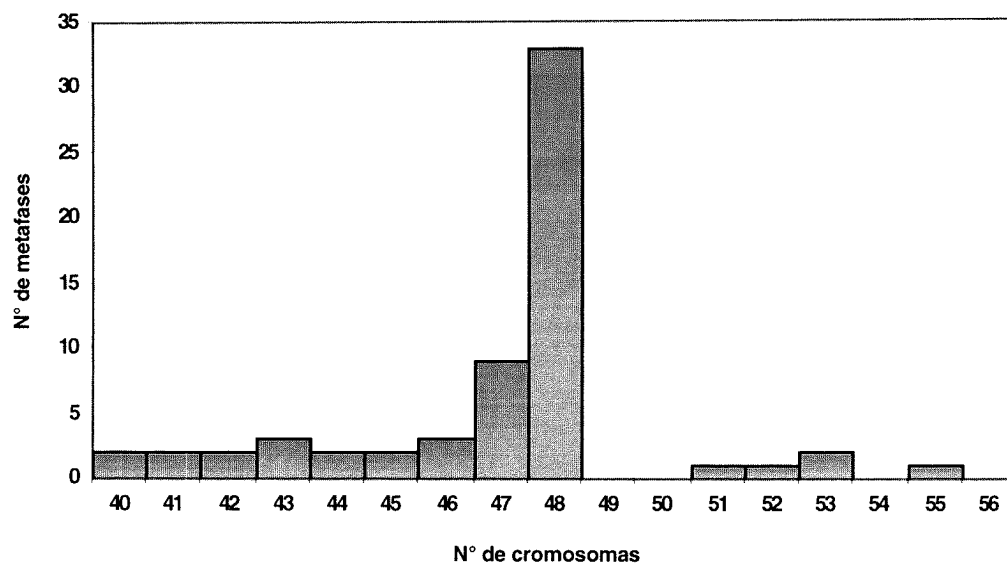


FIGURA 3

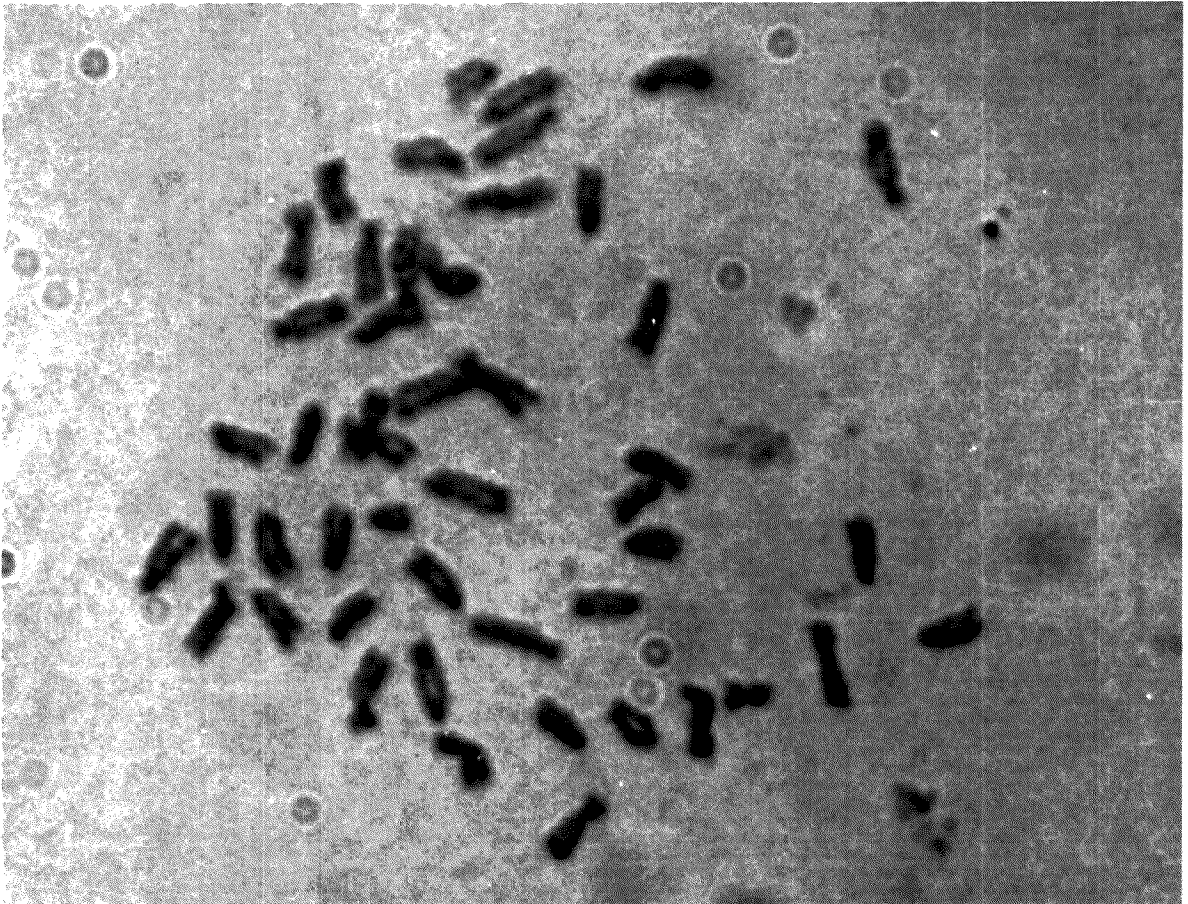


FIGURA 4

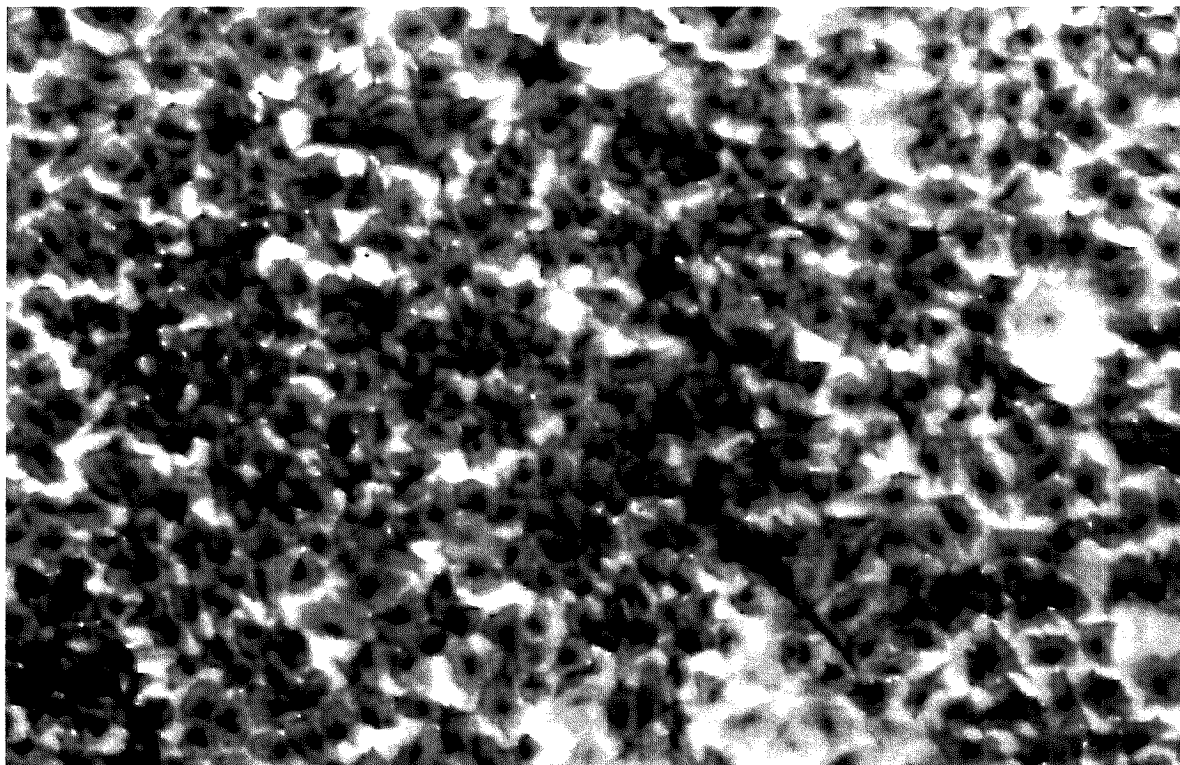


FIGURA 5

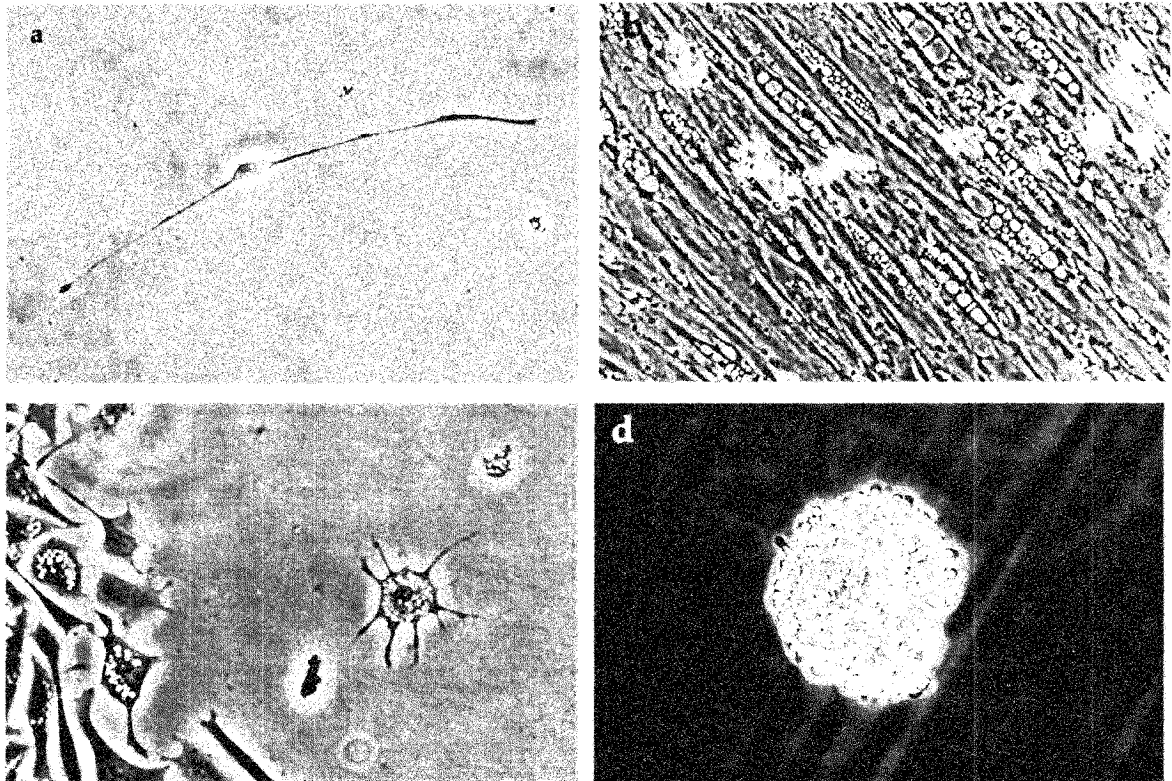


FIGURA 6

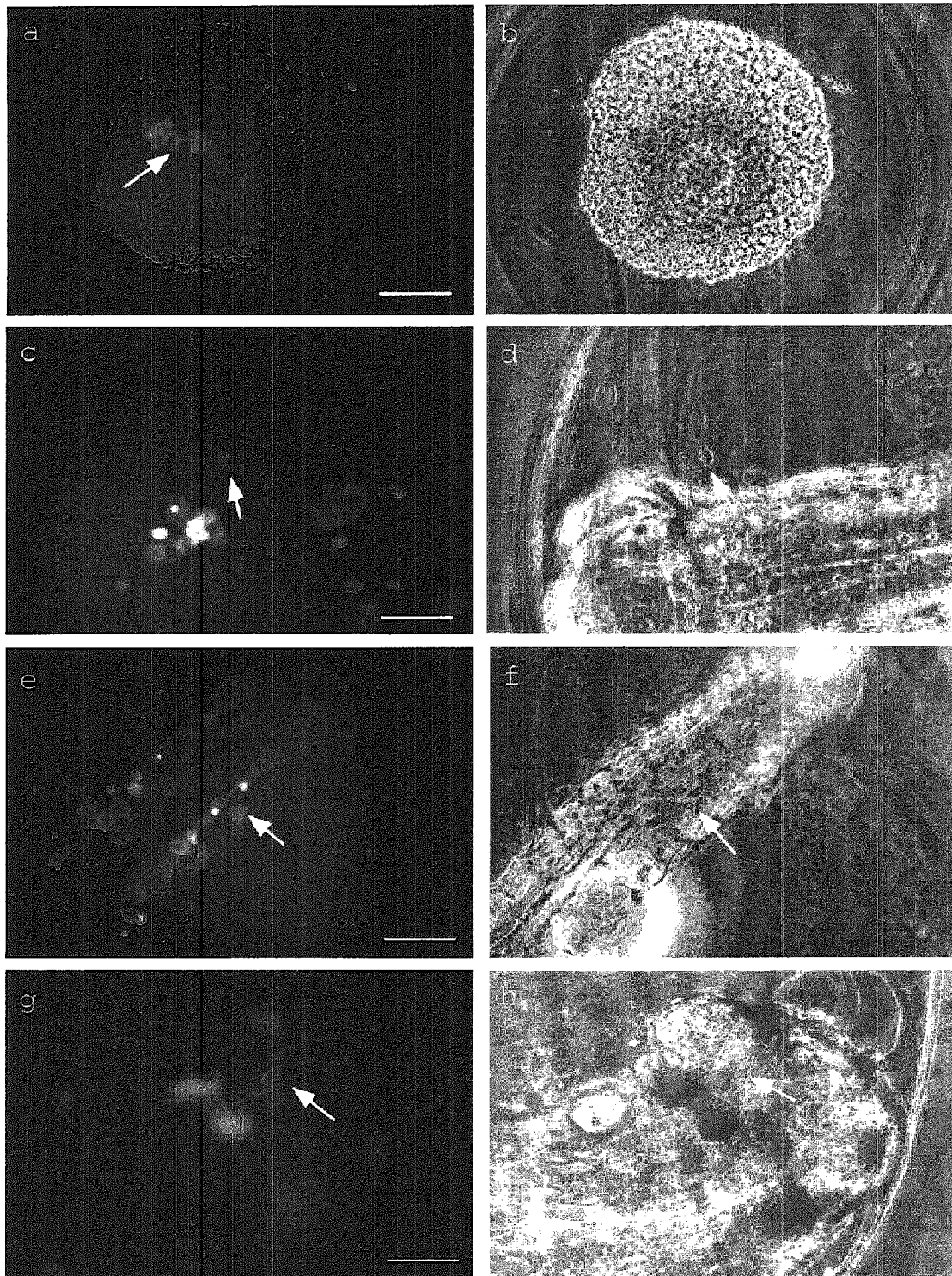


FIGURA 7



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 200 670

⑫ Nº de solicitud: 200200255

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **04.02.2002**

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ **Int. Cl.7:** C12N 5/02, 5/06

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BEJAR J. et al. Towards obtaining ES cells in the marine fish species Sparus aurata; multipassage maintenance, characterization and transfection. Genetic Analysis: Biomolecular Engineering, 1999, 15, 125-129. (Citado en la solicitud)	1
A	WAKAMATSU Y. et al. Establishment of a pluripotent cell line derived from a medaka (Oryzia latipes) blastula embryo. Mol. Mar. Biol. Biotechnol., 1994 Agosto, 3 (4): 185-91. (Citado en la solicitud)	1
A	HONG Y. et al. Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medakafish (Oryzia latipes). Mech. Dev., 1996 Nov., 60 (1): 33-44. (Citado en la solicitud)	1
A	SUN L. et al. ES-like cell cultures derived from early zebrafish embryos. Mol. Mar. Biol. Biotechnol., 1995 Sep., 4 (3): 193-9.	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

15.01.2004

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/1