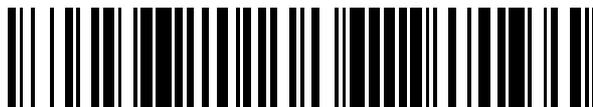


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 727**

21 Número de solicitud: 201431678

51 Int. Cl.:

C12N 15/873 (2010.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

14.11.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.03.2015

71 Solicitantes:

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y
TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA (INIA)
(90.0%)**

Ctra. de La Coruña, km. 7,5

28040 Madrid ES y

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (10.0%)

72 Inventor/es:

CARDÓNIGA VALIÑO, Carlos;

LÓPEZ DÍAZ, Maricruz y

BUJÁN VARELA, María Julia

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Métodos de eliminación celular**

57 Resumen:

Métodos de eliminación celular.

La presente invención está relacionada con metodologías de eliminación de células que expresan en su superficie antígenos determinados, en particular células germinales primordiales de un embrión aviar y células tumorales, las cuales no producen daños en otras poblaciones celulares. Tales metodologías están basadas en el marcaje selectivo de las células a eliminar con anticuerpos específicos y posterior destrucción celular de las células marcadas con el sistema del complemento. La invención se relaciona también con los embriones aviares y las aves quimera germinales derivados de dichas metodologías.

ES 2 531 727 A1

DESCRIPCIÓN

MÉTODOS DE ELIMINACIÓN CELULAR

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención está relacionada con metodologías para la eliminación de
células que presentan en su superficie un determinado antígeno, en particular células
germinales primordiales de un embrión aviar y células tumorales, mediante reconocimiento
de dicho antígeno y unión por parte de un anticuerpo específico y posterior unión de
10 proteínas del complemento, así como con embriones aviares y aves quimera germinales
resultantes de dichas metodologías.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Las peculiaridades morfo-fisiológicas de los embriones aviares condicionan
fuertemente los procedimientos de reproducción asistida que permiten la propagación de un
genotipo o una estirpe concreta a partir de células germinales crioconservadas *ex situ*. Uno
de tales procedimientos consiste en la construcción de quimeras de línea germinal mediante
injerto, en periodo embrionario, de las células germinales primordiales de la estirpe deseada
sobre un embrión receptor de otro linaje diferente. Las células germinales primordiales
20 (CGP) son las células embrionarias que desde un periodo muy temprano del desarrollo
están ya determinadas para colonizar las gónadas y dar allí lugar a las células germinales
(espermatozonias y oogonias y los gametos de ellas derivados). Cuando a un embrión en
desarrollo se le injertan células germinales primordiales exógenas (por ejemplo, de una raza
en peligro de extinción cuyas células germinales primordiales hayan sido conservadas en
25 congelación y que se desea propagar para restaurar una diversidad genética amenazada)
éstas migrarán a, y colonizarán, las gónadas del receptor del mismo modo que lo habrían
hecho en el embrión del que fueron extraídas. El receptor se convierte así en una quimera
germinal cuyas gónadas portarán células germinales (y producirán gametos) de las dos
estirpes diferentes, la del propio receptor y la injertada. Cuando esta quimera germinal, ya
30 adulta, se aparee de forma natural o asistida generará progenies de una u otra línea en
proporción variable según el grado de quimerismo logrado, es decir, según la proporción
entre las células germinales propias del receptor y las células germinales injertadas. De este
modo, se recupera en la primera generación filial aquel genotipo que en su día fue
crioconservado en forma de CGP.

35 Para mejorar los rendimientos de la técnica es importante aumentar en la medida de lo

posible el grado de quimerismo, para lo cual se aplican, con anterioridad al injerto, tratamientos conducentes a la inactivación parcial de la línea germinal del embrión receptor. Comúnmente, los métodos empleados son la irradiación y la administración de fármacos citotóxicos. En el primer caso se somete el huevo embrionado a una dosis predeterminada de radiación gamma o radiación X, cuyo efecto citotóxico es bien conocido; en el segundo suele emplearse el fármaco busulfán, un agente alquilante, que interfiere en la replicación del ADN provocando apoptosis celular, de toxicidad bien conocida. Ambos métodos son efectivos, pero totalmente inespecíficos, afectando por igual a todas las poblaciones de células embrionarias, de ahí que solo puedan aplicarse de manera restringida a fin de evitar daños en la viabilidad del embrión receptor y, por ende, el fracaso del procedimiento en su conjunto, resultando así que tan solo se logra, habitualmente, una limitada ablación de la línea germinal embrionaria del receptor.

Los procedimientos de irradiación o de tratamiento farmacológico para la ablación de células germinales descritos anteriormente se vienen aplicando con los fines descritos desde hace décadas. La acción del busulfán sobre las células germinales ha sido descrita tanto en rata como en aves. Desde entonces ha sido utilizado de forma generalizada con el fin de destruir las CGP en sus periodos de migración y proliferación embrionarias. De igual manera, la irradiación X o γ , cuyo efecto nocivo sobre la viabilidad celular es bien conocido se ha venido utilizando con el propósito de diezmar la población de CGP. La irradiación tiene, frente al tratamiento con busulfán, la ventaja de que la dosis efectiva a la que el embrión queda expuesto puede ajustarse con gran precisión, sin embargo tiene el inconveniente de que es igualmente nocivo para todas las poblaciones celulares, independientemente del momento del ciclo celular en que se encuentren.

Por otra parte, la acción citotóxica combinada de los anticuerpos y el sistema endógeno del complemento es bien conocida y se ha aplicado con diferentes fines terapéuticos y/o experimentales. Así, la combinación de complemento sérico con anticuerpos frente a células de carcinoma de Brown-Pearce logra inhibir el crecimiento del tumor en conejos previamente injertados con células cancerosas (Kalfayan B & Kidd JG 1953 J Exp Med 97(1): 145-162). Esta estrategia se ha utilizado con éxito en la terapéutica del cáncer, con más de 20 anticuerpos de diversas naturalezas ya autorizados por distintos organismos reguladores para el tratamiento de diferentes neoplasias (Macor & Tedesco 2007 Immunol Lett 111: 6-13). Uno de los problemas de ésta terapia es que el tumor es capaz de producir enzimas inhibitoras del sistema de complemento endógeno y así evadir la destrucción dirigida por los anticuerpos. Igualmente, la acción lítica del complemento se ha utilizado para destruir selectivamente una población de células musculares y nerviosas

embrionarias que expresan un determinado antígeno de superficie en embriones de pollo (Gerhart J *et al.* 2008 Biol Proced Online 10: 74-82).

Por otro lado, en el estado de la técnica se han descrito métodos de eliminación selectiva de células germinales primordiales en pez cebra, basados en el sistema bacteriano bicistrónico *parD* (Slanchev K *et al.* 2005 Proc Natl Acad Sci 102: 4074-4079).

A pesar de todo ello, aún existe la necesidad de desarrollar metodologías que permitan la eliminación selectiva de una población celular particular y que no resulten citotóxicas para otras poblaciones celulares, mediante las cuales puedan obtenerse quimeras aviares de línea germinal con un alto grado de quimerismo, con mayor especificidad de eliminación de células germinales primordiales y menor citotoxicidad para otros tipos celulares diferentes de las células germinales primordiales, así como la eliminación de células tumorales en un individuo.

COMPENDIO DE LA INVENCION

15

Los autores de la presente invención han desarrollado una metodología para la eliminación de células que expresan en su superficie antígenos determinados sin producir daños en otras poblaciones celulares. La metodología desarrollada está basada en el marcaje selectivo de las células a eliminar con anticuerpos específicos y posterior destrucción celular de las células marcadas con el complemento. Los autores de la presente invención han logrado marcar y destruir las células germinales primordiales de embriones de ave (ver Ejemplo 1) para su posterior uso como receptores de injertos de células germinales primordiales de otras especies, para poder así propagarlas. El método desarrollado por los inventores no afecta de forma sustancial a otras poblaciones celulares, por lo que no compromete la viabilidad general del embrión receptor.

Frente a los procedimientos comúnmente utilizados en la técnica (principalmente basados en radiación o en citotoxicidad) para la eliminación de células germinales primordiales, el método aquí descrito no requiere el uso de una equipación especial (tal como fuentes de radiación gamma), por lo que supone una ventaja en cuanto a costes y dotación de laboratorio necesaria frente a otras metodologías. Por otro lado, el método aquí descrito se caracteriza por su especificidad, de modo que, al ser aplicado en las dosis y pautas propuestas, resulta menos lesivo para el desarrollo de los embriones, por lo que resulta en un mejor rendimiento global. Además, en relación con la especificidad del método de eliminación de células germinales primordiales de un embrión aviar aquí descrito, permite una ablación casi completa (ausencia de células visibles en secciones de tejido gonadal) de

35

la población diana, a diferencia de los procedimientos habituales descritos en la técnica, en los que la población de células germinales primordiales se reduce en menos de un 50%.

Así, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un método de eliminación de células germinales primordiales en un embrión de un ave que comprende:

- 5 (i) poner en contacto las células germinales primordiales del embrión con un anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie celular de dichas células germinales primordiales, y
- (ii) poner en contacto, bien a continuación o bien simultáneamente con respecto a la etapa anterior, las células germinales primordiales con una composición que
- 10 comprende proteínas del sistema del complemento con capacidad de inducir lisis de células que presentan un anticuerpo unido a su superficie.

En un aspecto adicional, la invención se relaciona con un embrión aviar en el que se han eliminado al menos parte de las células germinales primordiales mediante el método de la invención anterior.

15 En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con un método de obtención de un embrión aviar quimera germinal que comprende:

- (i) eliminar las células germinales primordiales de un embrión de una primera ave mediante el método de la invención anterior, e
- (ii) injertar en el embrión de dicha primera ave células germinales primordiales
- 20 obtenidas a partir del embrión de una segunda ave.

En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con un embrión aviar quimera germinal obtenido mediante el método de la invención anterior.

En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con un método de obtención de un ave quimera germinal, que comprende

- 25 (i) implantar en un embrión aviar obtenido de acuerdo con el método de la invención anterior células germinales primordiales de un segundo ave y
- (ii) mantener el embrión obtenido en la etapa (ii) en condiciones adecuadas hasta completar su desarrollo embrionario.

En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con un ave quimera germinal obtenida mediante el método de la invención anterior que contiene células germinales primordiales de una segunda ave.

30

En un aspecto adicional, la presente invención se relaciona con un método de eliminación de una célula diana que comprende:

- (i) poner en contacto la célula diana a eliminar con un anticuerpo específico de un
- 35 antígeno presente en la superficie de dicha célula diana, y

(ii) poner en contacto simultáneamente respecto a la etapa anterior, la célula diana a eliminar con una composición que comprende proteínas del sistema del complemento con capacidad de inducir lisis de células que presentan un anticuerpo unido a su superficie.

5 En un último aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de un anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie de una célula tumoral diana y de una composición que comprende proteínas del sistema del complemento con capacidad de inducir lisis de células que presentan un anticuerpo unido a su superficie para preparar un medicamento para el tratamiento del cáncer que comprende dicha célula tumoral diana, en donde el anticuerpo específico y la composición que comprende proteínas del sistema del
10 complemento se administran al paciente de forma simultánea.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

15

El término “anticuerpo”, tal como se utiliza en la presente invención, hace referencia a una proteína con actividad de unión específica a una proteína particular denominada “antígeno” de modo que dicho anticuerpo incluye al menos una región variable de inmunoglobulina, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que proporciona un dominio
20 variable de inmunoglobulina o una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una región variable de la cadena pesada (H) (abreviada aquí como VH) y una región variable de la cadena ligera (L) (abreviada aquí como VL). Típicamente, un anticuerpo incluye dos regiones variables de la cadena pesada y dos regiones variables de la cadena ligera. El término “anticuerpo” comprende anticuerpos
25 completos, por ejemplo, inmunoglobulinas intactas y/o de longitud total de los tipos IgA, IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgE, IgD, IgM (así como subtipos de las mismas). Tal como se utiliza en la presente invención, el término “anticuerpo” comprende anticuerpos monoclonales, o anticuerpos policlonales, intactos, o fragmentos de ellos; e incluye anticuerpos humanos, humanizados y de origen no humano. Los “anticuerpos
30 monoclonales” son poblaciones homogéneas de anticuerpos, altamente específicos, que están dirigidos contra un único sitio o “determinante” antigénico.

En el contexto de la presente invención, el anticuerpo reconoce y se une de modo específico a un antígeno presente en la superficie celular de una célula diana, preferiblemente en donde dicha célula diana es una célula germinal primordial de un
35 embrión aviar o una célula tumoral, preferiblemente una célula tumoral de un mamífero, aún

más preferiblemente una célula tumoral humana.

El término “anticuerpo anti-EMA-1”, tal como se emplea en la presente invención, hace referencia a un anticuerpo que reconoce y se une de modo específico al antígeno de superficie celular de célula germinal primordial denominado EMA-1

5 El término “anticuerpo anti-integrina $\alpha 6$ ”, tal como se usa en la invención, hace referencia a un anticuerpo que reconoce y se une de modo específico al antígeno de superficie denominado integrina $\alpha 6$.

10 El término “anticuerpo anti-integrina $\beta 1$ ”, tal como se usa en la invención, hace referencia a un anticuerpo que reconoce y se une de modo específico al antígeno de superficie denominado integrina $\beta 1$.

Los términos “anticuerpo anti-SSEA1”, “anticuerpo anti-SSEA3”, y “anticuerpo anti-SSEA4”, tal como se emplean en la presente invención, hacen referencia, respectivamente, a un anticuerpo que reconoce y se une de modo específico al antígeno de superficie celular de célula germinal primordial denominado SSEA1, SSEA3 o SSEA4.

15 El término “antígeno”, tal como se usa en la presente invención, hace referencia a cualquier molécula o fragmento molecular que es capaz de inducir una respuesta inmune específica (es decir, humoral o celular) por el sistema inmune. Los antígenos tienen la capacidad de unirse al sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Los antígenos habitualmente son proteínas o polisacáridos. En el contexto de la invención, el antígeno está
20 presente en la superficie celular de una célula diana, en particular en la superficie de una célula germinal primordial de un embrión aviar, o en la superficie de una célula tumoral, preferiblemente una célula tumoral de un mamífero, aún más preferiblemente una célula tumoral humana.

25 El término “antígeno 1 de membrana epitelial” o “EMA-1” (*epithelial membrane antigen-1*), tal como se emplea en la presente invención, también denominado CA15-3, mucina epitelial polimórfica (PEM, *polymorphic epithelial mucin*), sialomucina, o episialina, hace referencia a una glicoproteína similar a mucina.

30 El término “antígeno embrionario estadio-específico 1” o “SSEA1” o “SSEA-1” (*stage-specific embryonic antigen 1*), tal como se emplea en la presente invención, también denominado “CD15”, “antígeno Le(X)” o “antígeno Lewis X”, hace referencia a un antígeno descrito por Gooi HC *et al.* 1981 Nature 292(5819):156-158 correspondiente al carbohidrato 3-fucosil-N-acetil-lactosamina.

35 El término “antígeno embrionario estadio-específico 3” o “SSEA3” o “SSEA-3” (*stage-specific embryonic antigen 3*), tal como se emplea en la presente invención, hace referencia a un antígeno con estructura de oligosacárido, formado por 5 unidades de carbohidrato

unidas a un esfingolípido.

El término “antígeno embrionario estadio-específico 4” o “SSEA4” o “SSEA-4” (*stage-specific embryonic antigen 4*), tal como se emplea en la presente invención, hace referencia a un antígeno con estructura de glucolípido.

5 El término “ave en peligro de extinción”, tal como se utiliza aquí, hace referencia a una especie de ave en la que todos los miembros vivos de dicha especie están en peligro de desaparecer, debido a la depredación directa sobre dicha especie, a la desaparición de un recurso del cual depende su vida, a la acción del hombre, a cambios en el hábitat, a desastres naturales o a cambios graduales del clima. A modo de ejemplo, un listado no exhaustivo de aves en peligro de extinción es el elaborado por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, *International Union for Conservation of Nature*) disponible en <http://www.iucnredlist.org/search>.

15 El término “ave transgénica”, tal como se utiliza aquí, hace referencia a un ave en la que se inserta deliberadamente un gen foráneo o transgén en su genoma, con el fin de modificar alguna característica del animal (bien porque el transgén introduce una nueva funcionalidad, bien porque el transgén bloquea la expresión de un gen particular del huésped, etc.). Dicho transgén se construye mediante la tecnología de ADN recombinante, de forma que, además de su secuencia, incluye otras que le permiten incorporarse al ADN del huésped y ser expresado correctamente por las células de éste. La tecnología de ADN recombinante para la generación de animales transgénicos es conocida ampliamente por el experto en la materia (Han JY 2009 *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 32(2): 61-80; Scott BB & Lois C 2006 *Nature Prot* 1: 1406-1411). En una realización particular, el ave transgénica es un ave cuyas células germinales primordiales han sido genéticamente modificadas.

25 El término “cáncer”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a la enfermedad que se caracteriza por una proliferación descontrolada de células anormales capaces de invadir tejidos adyacentes y diseminarse a órganos lejanos.

El término “célula germinal primordial”, tal como se utiliza en la presente invención, abreviado “CGP”, se entiende como una célula que deriva del tejido reproductivo de un macho o una hembra adultos y que es capaz de generar células madre de las células germinales, que darán lugar a gametos en el adulto sexualmente maduro, con capacidad de colonizar tejidos ováricos o testiculares estériles tras, por ejemplo, radiación o quimioterapia. Las células germinales primordiales pueden ser quiescentes o dividirse activamente en tejidos reproductivos adultos. En relación con un ave, el término “célula primordial germinal” se refiere a una célula diploide que se encuentra en el embrión inicial y que puede

diferenciarse/desarrollarse en gametos haploides (es decir, espermatozoides y óvulos) en una ave adulta. Las células germinales primordiales pueden aislarse de distintas etapas del desarrollo y de varios sitios del embrión aviar en desarrollo, tal como conoce el experto en la materia, incluida la cresta genital, la gónada en desarrollo, la sangre y el creciente germinal.

5 Habitualmente, las células germinales primordiales se tiñen positivamente mediante la técnica de ácido periódico Schiff (PAS). En varias especies pueden identificarse las células germinales primordiales utilizando un anticuerpo anti-SSEA-1 (a excepción, por ejemplo de los pavos, en los que las células germinales primordiales no muestran la región del antígeno SSEA). En el estado de la técnica se conocen varias técnicas para aislar y purificar las CGP,
10 que incluyen sin limitación la concentración de las CGP de la sangre utilizando centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll (Yasuda Y *et al.* 1992 J Reprod Fertil 96(2): 521-528).

El término “célula tumoral”, tal como se utiliza aquí, hace referencia a una célula maligna, también conocida como célula cancerosa o cancerígena, que crece y se divide más
15 allá de los límites normales invadiendo el tejido circundante y produciendo en ocasiones metástasis.

El término “embrión”, tal como se una en el presente documento en relación a un ave, se refiere a un ovocito fertilizado, es decir, al resultado de la fusión de un ovocito y un espermatozoide. En el caso particular de un embrión de pollo, este se desarrolla durante 20-
20 21 días. El desarrollo de un embrión de un ave comprende las etapas de huevo, blástula, gástrula (etapas HH1-HH4 según Hamburger-Hamilton), neurulación (etapas HH5-HH6), formación de somitas (etapas HH7-HH20) y formación de apéndices (a partir de la etapa HH21).

El término “estadio del desarrollo embrionario”, tal como se utiliza aquí, hace
25 referencia a cada una de las diferentes etapas de desarrollo de un embrión, en particular de un embrión de un ave, más en particular de un embrión de un ave del género *Gallus*.

En el estado de la técnica se han descrito en detalle los diferentes estadios que conforman el desarrollo embrionario aviar. Un sistema de nomenclatura de los diferentes estadios del desarrollo embrionario es el propuesto por Hamburger-Hamilton (Hamburger V & Hamilton HL 1951 J Morphol 88(1): 49-92; Hamburger V & Hamilton HL 1992 Dev Dyn
30 195(4): 231-272), en el que se definen 46 estadios cronológicos del desarrollo embrionario del pollo (*Gallus gallus*) en base a diferentes características morfológicas, denominados respectivamente HH1-HH46, y que comprenden desde la puesta del huevo hasta la eclosión del polluelo. Otro sistema de nomenclatura de los estadios de desarrollo embrionario aviar
35 es el propuesto por Eyal-Gilaldi & Kochav (EK) (Eyal-Gilaldi H & Kochav S 1976 Develop

Biol 49: 321-337), en el que se describen 14 estadios de desarrollo (denominados estadios EK I-XIV o simplemente estadios I-XIV) que comprenden desde la escisión hasta la formación de la línea primitiva, y que corresponden a etapas que preceden el estadio 2 según Hamburger-Hamilton (estadio HH2).

5 El término “género *Gallus*”, tal como se utiliza aquí, hace referencia a un género de aves galliformes de la familia *Phasianidae* que incluye la especie doméstica *Gallus gallus* así como las especies *Gallus lafayetii*, *Gallus sonneratii*, y *Gallus varius*. En una realización particular, el ave del género *Gallus* es *Gallus gallus* (pollo común).

10 El término “integrina $\alpha 6$ ”, tal como se usa en la presente invención, hace referencia a una integrina de cadena $\alpha 6$ que está presente en la superficie celular.

El término “integrina $\beta 1$ ”, tal como se usa en la presente invención, hace referencia a una integrina de cadena $\beta 1$ que está presente en la superficie celular.

15 El término “lisis celular”, tal como se usa en la presente invención, hace referencia a la rotura de la membrana celular de una célula diana, en donde dicha célula diana es una célula germinal primordial aviar o una célula tumoral, preferiblemente una célula tumoral humana, y a la posterior liberación de todo o parte del contenido de dicha célula diana. En el contexto de la presente invención, la lisis celular está mediada por la unión de un anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie celular de la célula diana, y de proteínas del sistema del complemento, en donde las proteínas del sistema del complemento tienen la capacidad de inducir la lisis de las células que presentan dicho anticuerpo unido a su superficie.

20 La expresión “poner en contacto con”, tal como se utiliza aquí en relación a la célula a eliminar mediante los métodos de la invención, hace referencia al proceso por el cual una célula que presenta un determinado antígeno en superficie y susceptible de ser eliminada entra en contacto con un anticuerpo específico de dicho antígeno de superficie y/o con proteínas del complemento según la invención. Esta expresión incluye cualquier proceso *in vivo* e *in vitro* de poner en contacto tal célula con el anticuerpo y/o con el complemento según la invención.

30 El término “quimera germinal”, tal como se usa en la presente invención en relación con embriones aviares y aves quimeras germinales, hace referencia a un embrión o a un ave resultante del desarrollo embrionario en el que se tienen tanto células germinales primordiales propias de dicho embrión como células germinales primordiales procedentes de un segundo embrión aviar, es decir, que presenta tanto células germinales primordiales propias como exógenas, éstas últimas implantadas en el embrión mediante injerto o similar.

El término “sistema del complemento” o simplemente “complemento”, tal como se emplea aquí, hace referencia al conjunto de moléculas plasmáticas implicadas en diferentes reacciones bioquímicas en cascada implicadas en la respuesta inmune, cuyas funciones incluyen potenciar la respuesta inflamatoria, facilitar la fagocitosis y dirigir la lisis celular. El sistema del complemento comprende unas 30 proteínas presentes en el suero, que interactúan entre sí de modo regulado en forma de cascada enzimática, permitiendo una amplificación de la respuesta inmune humoral. La activación de este sistema puede producirse mediante la vía clásica, la vía alternativa o la vía de las lectinas. La vía clásica conecta con el sistema inmune adaptativo por medio de su interacción con inmunocomplejos. En la ruta clásica, los componentes del complemento comprenden (en orden de actuación) C1q, C1r, C1s, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8 y C9. La ruta alternativa conecta con el sistema de inmunidad natural o inespecífica, interactuando directamente con la superficie del microorganismo. En la ruta alternativa, los componentes o factores comprenden factor B, factor D, factor H, factor P. La ruta de las lectinas supone una variante de la ruta clásica, pero que se inicia sin necesidad de anticuerpos. Como consecuencia de la activación y fijación del complemento se produce: la lisis del microorganismo o célula diana, la opsonización (lo cual mejora la fagocitosis y destrucción), los productos difusibles del complemento activado provocan un incremento de la quimiotaxis sobre los fagocitos y funcionan como anafilotoxinas en el control de la respuesta inflamatoria, amplificación de la respuesta humoral específica, y eliminación de los inmunocomplejos.

Método de eliminación de células germinales primordiales en un embrión aviar

En un primer aspecto, la presente invención está dirigida a un método de eliminación de células germinales primordiales en un embrión de un ave que comprende:

- poner en contacto las células germinales primordiales del embrión con un anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie celular de dichas células germinales primordiales, y
- poner en contacto, bien a continuación o bien simultáneamente con respecto a la etapa anterior, las células germinales primordiales con una composición que comprende proteínas del sistema del complemento con capacidad de inducir lisis de células que presentan un anticuerpo unido a su superficie.

En una primera etapa del método de eliminación de células germinales primordiales de un embrión aviar según la presente invención, las células germinales primordiales se ponen en contacto con un anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie de dichas

células.

Para ello, la puesta en contacto de las células germinales primordiales de un embrión aviar con el anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie de dichas células germinales primordiales tiene lugar en un estadio del desarrollo embrionario previo a la migración y colonización gonadal por parte de dichas células germinales primordiales. En particular, dicha puesta en contacto tiene lugar en el estadio HH15 del desarrollo embrionario aviar o en un estadio anterior a HH15, en donde el estadio HH15 corresponde al estadio embrionario 15 descrito por Hamburger-Hamilton.

Los estadios del desarrollo embrionario aviar han sido descritos en el estado de la técnica. En particular, en el contexto de la presente invención, se sigue la nomenclatura de estadios del desarrollo embrionario HH1-HH46 descrita por Hamburger-Hamilton (Hamburger V & Hamilton HL 1951 J Morphol 88(1): 49-92; Hamburger V & Hamilton HL 1992 Dev Dyn 195(4): 231-272) y la nomenclatura de estadios del desarrollo embrionario I-XIV descrita por Eyal-Giladi & Kochav (EK) (Eyal-Giladi H & Kochav S 1976 Develop Biol 49: 321-337). Así, la puesta en contacto de las células germinales primordiales de un embrión aviar con el anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie de dichas células germinales primordiales según el método de la invención tiene lugar en el estadio HH15 de desarrollo embrionario o en un estadio anterior (estadios desde HH1 hasta HH14). En particular, el estadio HH15 corresponde al estadio de 24-27 somitos (50-55 horas) en el que el amnión se extiende a los somitos 7-14 y la copa óptica está completamente formada. En una realización más particular, la puesta en contacto de las células germinales primordiales de un embrión aviar con el anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie de dichas células germinales primordiales según el método de la invención tiene lugar en el estadio HH10 de desarrollo embrionario o en un estadio anterior (estadios desde HH1 hasta HH9). En particular, el estadio HH10 corresponde al estadio de 10 somitos (33-38 horas), en el que el primer somito se vuelve disperso, hay una primera indicación de flexión craneal, son claramente visibles tres vesículas cerebrales primarias, y el corazón queda situado ligeramente hacia la derecha (ver Hamburger V & Hamilton HL 1951 J Morphol 88(1): 49-92).

La puesta en contacto de las células germinales primordiales de un embrión aviar con el anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie de dichas células germinales primordiales de acuerdo a la primera etapa del método de eliminación de células germinales primordiales de la invención puede tener lugar en diferentes localizaciones embrionarias. De este modo, en una realización particular, la puesta en contacto de las células germinales primordiales con el anticuerpo específico de un

antígeno presente en la superficie de dichas células se lleva a cabo mediante administración de dicho anticuerpo específico mediante aplicación subgerminal, o mediante aplicación sobre membrana perivitelina.

En una realización particular, la administración del anticuerpo se lleva a cabo mediante aplicación subgerminal. En una realización preferida, la aplicación subgerminal del anticuerpo se produce entre los estadios X y XII del embrión, en donde los estadios X y XII corresponden a los estadios embrionarios según Eyal-Gilaldi & Kochav (EK) definidos anteriormente, siendo X el estadio típico de huevo en el momento de la puesta, con un epitelio ya bien organizado en su cara dorsal y desprendimiento casi completo de las células de las capas inferiores, muchas de las cuales pueden verse en el interior de la cavidad subgerminal. A este estadio X sigue el periodo de formación del hipoblasto, que en el estadio XII cubre ya la mitad posterior de la superficie ventral del blastodermo en una lámina epitelial casi continua. La aplicación subgerminal es conocida por el experto en la materia y se lleva a cabo, a modo de ejemplo no limitante, tal como se describe en el Ejemplo 1, apartado 1.2, de la presente solicitud.

En una realización particular alternativa, la administración del anticuerpo se lleva a cabo mediante aplicación sobre membrana perivitelina. En una realización preferida, la administración sobre membrana perivitelina del anticuerpo se produce en un estadio anterior al estadio HH5 del embrión, en donde el estadio HH5 corresponde al estadio embrionario según Hamburger-Hamilton definido anteriormente. En particular, el estadio HH5 (19-22 horas) corresponde al estadio embrionario caracterizado por que la notocorda es visible a modo de una barra de mesodermo condensado que se extiende hacia adelante desde el extremo anterior del nodo de Hensen. La aplicación perivitelina es conocida por el experto en la materia y se lleva a cabo, a modo de ejemplo no limitante, tal como se describe en el Ejemplo 1, apartado 1.1, de la presente solicitud.

Las células germinales primordiales del embrión aviar se ponen en contacto con un anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie de dichas células. Según la presente invención, cualquier anticuerpo con capacidad de reconocimiento y de unión específica a un antígeno presente en la superficie celular de una célula germinal primordial de un embrión aviar, en particular de un antígeno presente en la superficie celular de una célula germinal primordial de un embrión aviar en un estadio del desarrollo embrionario previo a la migración y colonización gonadal por parte de dichas células germinales primordiales, aún más en particular de un antígeno presente en la superficie celular de una célula germinal primordial de un embrión aviar en un estadio del desarrollo embrionario HH15 o anterior, puede emplearse en el contexto del presente método.

En una realización particular, el anticuerpo específico del antígeno presente en la superficie celular de dichas células germinales primordiales se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-SSEA1 (anti-antígeno embrionario estadio-específico 1), un anticuerpo anti-EMA-1 (anti-antígeno 1 de membrana epitelial), un anticuerpo anti-SSEA3 (anti-antígeno embrionario estadio-específico 3), un anticuerpo anti-SSEA4, un anticuerpo anti-integrina $\alpha 6$ y un anticuerpo anti-integrina $\beta 1$. En una realización preferida, el anticuerpo específico del antígeno presente en la superficie celular de dichas células germinales primordiales es un anticuerpo anti-SSEA1.

Ejemplos no limitantes de anticuerpos anti-EMA-1 de interés en el contexto de la presente invención incluyen, entre otros, el anticuerpo monoclonal de ratón EMA201 (Abcam, número de catálogo ab115978) y el anticuerpo monoclonal de ratón del clon E29 (Gennova Scientific, número de catálogo AP10196) o el anticuerpo monoclonal de ratón EMA-1 desarrollado por Eddy y Hahnel y distribuido por el Banco de Hibridomas de Estudios del Desarrollo (*Developmental Studies Hybridoma Bank*, Iowa City, IA).

Ejemplos no limitantes de anticuerpos anti-SSEA1 de interés en el contexto de la presente invención incluyen, el anticuerpo anti-SSEA1 monoclonal de ratón MC480 (Abcam, número de catálogo ab16285; Banco de Hibridomas de Estudios del Desarrollo).

Ejemplos no limitantes de anticuerpos anti-SSEA3 de interés en el contexto de la presente invención incluyen, el anticuerpo anti-SSEA3 monoclonal de rata MC631 (Abcam, número de catálogo ab16286).

Ejemplos no limitantes de anticuerpos anti-SSEA4 de interés en el contexto de la presente invención incluyen, el anticuerpo anti-SSEA4 monoclonal de ratón MC813 (Abcam, número de catálogo ab16287).

Ejemplos no limitantes de anticuerpos anti-integrina $\alpha 6$ de interés en el contexto de la presente invención incluyen, el anticuerpo MAB1378 de Millipore, el anticuerpo MAB13444 de Millipore, y el anticuerpo sc-19622 monoclonal de rata de Santa Cruz Biotechnology.

Ejemplos no limitantes de anticuerpos anti-integrina $\beta 1$ de interés en el contexto de la presente invención incluyen, los anticuerpos MAB2253Z, MAB2259Z y MAB2253 de Millipore, el anticuerpo 44-872G policlonal de conejo de Invitrogen y el anticuerpo sc-53711 monoclonal de ratón de Santa Cruz Biotechnology.

En una segunda etapa del método de eliminación de células germinales primordiales de un embrión aviar según la presente invención, dichas células germinales primordiales se ponen en contacto con una composición que comprende proteínas del sistema del complemento con capacidad de inducir la lisis de células que presentan un anticuerpo unido a su superficie.

La segunda etapa puede transcurrir de modo consecutivo o de modo simultáneo con respecto a la primera etapa anterior. Así, en una realización particular, las células germinales primordiales se ponen en contacto con un anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie celular de dichas células y a continuación, tras un periodo de incubación con el anticuerpo adecuado, con una composición que comprende proteínas del sistema del complemento con capacidad de inducir lisis de células que presentan un anticuerpo unido a su superficie. En una realización particular alternativa, las células germinales primordiales se ponen en contacto de modo simultáneo con una composición que comprende proteínas del sistema del complemento con capacidad de inducir lisis de células que presentan un anticuerpo unido a su superficie.

Tal y como se ha descrito anteriormente en relación con el anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie celular de las células germinales primordiales, la puesta en contacto de las células germinales primordiales con proteínas del sistema del complemento se lleva a cabo en un estadio del desarrollo embrionario previo a la migración y colonización gonadal por parte de dichas células germinales primordiales. En una realización particular, la puesta en contacto de las células germinales primordiales con proteínas del sistema del complemento se lleva a cabo en el estadio HH15 del desarrollo embrionario aviar o en un estadio anterior a HH15, en donde el estadio HH15 corresponde al estadio embrionario 15 descrito por Hamburger-Hamilton. En una realización aún más particular, la puesta en contacto de las células germinales primordiales con proteínas del sistema del complemento se lleva a cabo en el estadio HH10 del desarrollo embrionario aviar o en un estadio anterior a HH10, en donde el estadio HH10 corresponde al estadio embrionario 10 descrito por Hamburger-Hamilton.

Tal y como se ha descrito anteriormente en relación con el anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie celular de las células germinales primordiales, la puesta en contacto de las células germinales primordiales con la composición que comprende proteínas del sistema del complemento con capacidad de inducir lisis de células que presentan un anticuerpo unido a su superficie tiene lugar mediante administración de dicha composición del complemento mediante aplicación subgerminal, o mediante aplicación sobre membrana perivitelina.

En una realización particular, la administración del complemento se lleva a cabo mediante aplicación subgerminal. En una realización particular, cuando la aplicación de las proteínas del complemento es subgerminal, la etapa de puesta en contacto de las células germinales primordiales con el complemento se produce a continuación de la puesta en contacto de dichas células germinales con el anticuerpo específico de un antígeno presente

en la superficie de dichas células tras una breve incubación. En una realización preferida, la aplicación subgerminal del anticuerpo se produce entre los estadios X y XII del embrión, en donde los estadios X y XII corresponden a los estadios embrionarios según Eyal-Giladi & Kochav (EK) definidos anteriormente.

5 En una realización particular alternativa, la administración del complemento se lleva a cabo mediante aplicación sobre membrana perivitelina. En una realización particular, cuando la aplicación de las proteínas del complemento es sobre la membrana perivitelina, la etapa de puesta en contacto de las células germinales primordiales con el complemento se produce bien a continuación o bien simultáneamente respecto de la puesta en contacto de
10 dichas células germinales con el anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie de dichas células. En una realización preferida, la administración sobre membrana perivitelina del anticuerpo se produce en un estadio anterior al estadio HH5 del embrión, en donde el estadio HH5 corresponde al estadio embrionario según Hamburger-Hamilton definido anteriormente.

15 Las proteínas del complemento en contacto con las células germinales primordiales pueden ser bien endógenas o bien exógenas en relación a dichas células germinales. En una realización particular, las proteínas del complemento en contacto con las células germinales primordiales son exógenas, es decir, proceden de un individuo diferente del individuo cuyas células germinales primordiales se desea eliminar, en particular proceden de
20 un individuo de una especie diferente a la del individuo cuyas células germinales primordiales se desea eliminar. En una realización particular, las proteínas de complemento en contacto con las células germinales primordiales a eliminar de acuerdo con el método de la presente invención son proteínas de complemento de conejo.

Las células germinales primordiales eliminadas mediante el método de la invención
25 son células de un embrión aviar. El método de la invención puede ser empleado en la eliminación de células germinales primordiales de cualquier ave. En una realización particular, el ave cuyas células germinales primordiales son eliminadas mediante el método de la invención es un ave de la familia de los faisánidos (*Phasianidae*) que incluye gallos, faisanes, pavos, perdices, codornices y otras aves terrestres, o bien es un ave del orden
30 Falconiforme, que incluye las familias *Cathartidae* (catártidos), *Pandionidae*, *Accipitridae* (accipítridos), *Sagittariidae* y *Falconidae* (falcónidos). En una realización particular, el ave cuyas células germinales primordiales son eliminadas mediante el método de la invención es un ave del género *Gallus*, en particular es un ave de la especie *Gallus gallus* (gallo).

En una realización particular, el método de eliminación de células germinales
35 primordiales de la presente invención da lugar a un embrión aviar que presenta una

eliminación de al menos el 40% de las células germinales primordiales, preferiblemente de al menos el 50% de las células germinales primordiales, más preferiblemente de al menos el 70% de las células germinales primordiales, aún más preferiblemente de al menos el 90% de las células germinales primordiales o al menos un 91%, un 92%, un 93%, un 94%, un 5 95%, un 96%, un 97%, un 98%, un 99% de las células germinales primordiales.

Métodos para determinar el porcentaje de eliminación de células germinales primordiales en un embrión aviar son conocidas por el experto en la materia e incluyen, sin limitación, la inmunohistoquímica que comprende un anticuerpo anti-SSEA-1 (este factor se expresa en la superficie de las células germinales primordiales en el momento de la 10 migración para asentarse en las gónadas), y la inmunohistoquímica basada en un anticuerpo anti-vasa (DDX4), tal y como se describe en el apartado 1.1. del Ejemplo 1 recogido en la presente solicitud.

En una realización particular, el método de eliminación de células germinales primordiales de la presente invención resulta en un embrión aviar en el que tiene lugar una 15 eliminación de menos del 5%, menos del 4%, menos del 3%, menos del 2%, menos del 1%, menos del 0,5%, menos del 0,1%, menos del 0,05%, menos del 0.01% de células embrionarias distintas a las células germinales primordiales.

Tal como se ha recogido anteriormente, los inventores de la presente invención han desarrollado una metodología para la eliminación de las células germinales primordiales de 20 un embrión aviar, en la que dicho método tienen una mayor eficiencia de eliminación de las células germinales primordiales, una mayor especificidad y una menor citotoxicidad respecto a los métodos disponibles en el estado de la técnica. Como resultado de dicho método, se obtienen embriones en los que parte de las células germinales primordiales han sido eliminadas.

Por tanto, en un aspecto adicional, la presente invención se dirige a un embrión aviar 25 en el que se han eliminado parte de las células germinales primordiales mediante el método de eliminación de células germinales primordiales de un embrión aviar según la invención descrito anteriormente.

En una realización particular, el embrión aviar obtenido según el método de la 30 presente invención presenta una eliminación de al menos el 30% de las células germinales primordiales, preferiblemente de al menos el 50% de las células germinales primordiales, más preferiblemente de al menos el 70% de las células germinales primordiales, aún más preferiblemente de al menos el 90% de las células germinales primordiales o al menos un 91%, un 92%, un 93%, un 94%, un 95%, un 96%, un 97%, un 98%, un 99% de las células 35 germinales primordiales.

Métodos para determinar el porcentaje de eliminación de células germinales primordiales en un embrión aviar son conocidas por el experto en la materia e incluyen, sin limitación, la inmunohistoquímica que comprende un anticuerpo anti-SSEA-1 (este factor se expresa en la superficie de las células germinales primordiales en el momento de la migración para asentarse en las gónadas), y la inmunohistoquímica basada en un anticuerpo anti-vasa (DDX4), tal y como se describe en el apartado 1.1. del Ejemplo 1 recogido en la presente solicitud.

En una realización particular, el embrión aviar obtenido de acuerdo al método de eliminación de células germinales primordiales de la presente invención resulta en un embrión en el que tiene lugar una disminución de menos del 5%, menos del 4%, menos del 3%, menos del 2%, menos del 1%, menos del 0,5%, menos del 0,1%, menos del 0,05%, menos del 0.01% de células embrionarias distintas a las células germinales primordiales.

Tal y como se ha explicado anteriormente, como resultado del método de la invención para la eliminación de las células germinales primordiales de un embrión aviar, se obtienen embriones en los que parte o la totalidad de las células germinales primordiales han sido eliminadas. Dichos embriones pueden servir a su vez como receptores de células germinales primordiales de una segunda ave, de modo que se tienen embriones aviares en los que se tienen tanto células germinales primordiales propias como células germinales primordiales procedentes de una segunda ave, es decir, embriones quimera en los que se tienen tanto células del propio embrión como de un segundo embrión diferente.

Por lo tanto, en otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método de obtención de un embrión aviar quimera germinal que comprende:

(i) eliminar las células germinales primordiales de un embrión de una primera ave mediante el método de eliminación de células germinales primordiales en un embrión aviar de la invención, tal como se ha descrito anteriormente, e

(ii) injertar en el embrión de dicha primera ave células germinales primordiales obtenidas a partir del embrión de una segunda ave.

Así, en una primera etapa, el método de obtención de un embrión aviar quimera germinal según la invención comprende eliminar, al menos en parte, las células germinales primordiales de un embrión de una primera ave, para lo cual se sigue el método de eliminación de células germinales primordiales en un embrión aviar descrito anteriormente en la presente solicitud.

En una segunda etapa, el método de obtención de un embrión aviar quimera germinal según la invención comprende injertar en el embrión de una primera ave, cuyas células

germinales primordiales han sido eliminadas al menos en parte, células germinales primordiales obtenidas a partir del embrión de una segunda ave.

Métodos de obtención de células germinales primordiales a partir de un embrión aviar son conocidos por el experto en la materia e incluyen, sin quedar limitados a, aislamiento de
5 células germinales primordiales a partir de sangre embrionaria de la arteria dorsal mediante purificación por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll, así como los métodos descritos por Naito (Naito M *et al.* 2010 J Poult Sci 47: 57-64) y por Kuwana (Kuwana T *et al.* 1996 Int J Dev Biol 40: 1061-1064).

Las células germinales primordiales del embrión de la segunda ave pueden ser células
10 obtenidas inmediatamente antes de proceder al injerto de las mismas, o bien células mantenidas en condiciones adecuadas hasta proceder al injerto de las mismas (mediante, por ejemplo, crioconservación), o bien células que se han mantenido *in vitro* durante un número variable de pases antes de proceder al injerto de las mismas.

En una realización particular, la segunda ave de la que se obtienen células germinales
15 primordiales para su injerto en el embrión de una primera ave cuyas células germinales primordiales han sido eliminadas es un ave en peligro de extinción o es un ave transgénica. De este modo, el método de obtención de un embrión aviar quimera germinal de la presente invención es de interés en la propagación de especies aviares de diversidad genética amenazada, de modo que al injertar células primordiales exógenas (por ejemplo, de una
20 raza en peligro de extinción cuyas células germinales primordiales hayan sido conservadas en congelación y que se desee propagar para restaurar una diversidad genética amenazada) en un embrión cuya células germinales primordiales hayan sido eliminadas, al menos en parte. Así, cuando se injerten en el embrión las células germinales primordiales exógenas, éstas migrarán a, y colonizarán, las gónadas del embrión receptor del mismo
25 modo que lo habrían hecho en el embrión del que fueron extraídas. El receptor se convierte así en una quimera germinal cuyas gónadas portarán células germinales (y producirán gametos) de las dos estirpes diferentes, la del propio receptor y la injertada. Cuando esta quimera germinal, ya adulta, se aparee de forma natural o asistida generará progenies de una u otra línea en proporción variable según el grado de quimerismo logrado, es decir,
30 según la proporción entre las células germinales propias del receptor y las células germinales injertadas. De este modo, se recupera en la primera generación filial el genotipo conservado (por ejemplo, mediante crioconservación) en forma de célula germinal primordial. El método de la invención también resulta de interés en la propagación de aquellos individuos transgénicos en los que hay problemas reproductivos o de propagación.

35 Asimismo, la presente invención se refiere a un embrión aviar quimera germinal en el

que se han eliminado al menos parte de las células germinales primordiales mediante el método de obtención de un embrión aviar quimera germinal anterior. El embrión aviar quimera germinal de acuerdo a la presente invención contiene al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% de las células germinales primordiales procedentes del segundo ave.

En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método de obtención de un ave quimera germinal, que comprende

- (i) implantar en un embrión aviar, obtenido de acuerdo con el método de la invención de obtención de un embrión aviar quimera germinal descrito anteriormente, células germinales primordiales de un segundo ave y
- (ii) mantener el embrión obtenido en la etapa (i) en condiciones adecuadas hasta completar su desarrollo embrionario.

En una primera etapa, en el embrión aviar obtenido según el método de la invención, es decir, un embrión aviar en el que se han eliminado al menos en parte las células germinales primordiales, se implantan células germinales primordiales de un segundo ave. Métodos de implantación de células germinales primordiales en un embrión aviar son conocidos por el experto en la materia e incluyen, sin quedar limitados a, los métodos de inyección en el tracto cardíaco (Macdonald J *et al.* 2010 Plos One 5(11): e15518) o en aorta dorsal (Park TS *et al.* 2002 Biol Reprod 68(5): 1657-1662) de embriones HH16-17; o la inyección en el creyente germinal (Mozdziak EP *et al.* 2006 Poultry Science 85:1764–1768) o en vasos del sistema de membranas corioalantoideas (Lu Y *et al.* 2014 Stem Cells Dev 23(15): 1755-1764) o incluso mediante deposición de las células en cuestión en la cavidad celómica del embrión aviar en el que los esbozos gonadales están ya presentes (Naito M *et al.* 2007 Br Poult Sci 48(2): 121-126) o cualquiera otro de los procedimientos descritos por Nakamura *et al.* (Nakamura Y *et al.* 2013 Dev Growth Differ 55(1): 20-40).

En una segunda etapa, se mantiene el embrión obtenido en la etapa anterior (i) en condiciones adecuadas hasta completar su desarrollo embrionario. En el estado de la técnica se describen métodos rutinarios de mantenimiento de embriones aviares hasta completar el desarrollo los cuales incluyen, sin quedar limitados a, el cultivo del embrión en cáscaras nodriza (descrito en Perry MM 1988 Nature 331: 70-72) o el cultivo embrionario *in vitro* en recipientes adecuados, por ejemplo en recipientes plásticos o recipientes de vidrio. Las condiciones adecuadas de desarrollo de un embrión hasta completar su desarrollo comprenden condiciones adecuadas de humedad, temperatura, que son conocidas por el

experto en la materia para la especie aviar particular cuyo embrión se desarrolla, así como condiciones de volteo adecuadas en caso de que el cultivo embrionario se lleve a cabo *in vitro* en un recipiente adecuado para su cultivo. En una realización particular, el desarrollo embrionario transcurre a una temperatura de 37 °C y atmósfera saturada de humedad.

5 Asimismo, la presente invención se refiere a un ave quimera germinal obtenida a partir de un embrión en el que se han eliminado al menos parte de las células germinales primordiales mediante el método de obtención definido anteriormente y en el que se han introducido células germinales primordiales de una segunda ave.

10 Método de eliminación de una célula diana tumoral

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método de eliminación de una célula diana que comprende:

- 15 (i) poner en contacto la célula diana a eliminar con un anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie de dicha célula diana, y
- (ii) poner en contacto simultáneamente respecto a la etapa anterior, la célula diana a eliminar con una composición que comprende proteínas del sistema del complemento con capacidad de inducir lisis de células que presentan un anticuerpo unido a su superficie.

20 Así, en una primera etapa, la célula diana a eliminar se pone en contacto con un anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie de dicha célula diana.

En una realización particular del método de eliminación de una célula diana según la presente invención, dicha célula diana es una célula tumoral. En una realización preferida, la célula diana a eliminar es una célula tumoral de un mamífero, preferiblemente una célula 25 tumoral humana.

Células diana tumorales de acuerdo a la presente invención incluyen, sin limitación, células tumorales procedentes de abdomen, hueso, mama, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (suprarrenales, paratiroides, hipófisis, testículos, ovarios, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema 30 linfático, pelvis, piel, tejido blando, bazo, tórax y aparato genitourinario y, más particularmente, células tumorales derivadas de leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma corticosuprarrenal, cáncer hepatocelular en adultos (primario), cáncer de hígado en adultos (primario), leucemia linfocítica aguda en adultos, leucemia mieloide aguda en 35 adultos, enfermedad de Hodgkin en adultos, linfoma de Hodgkin en adultos, leucemia

linfocítica en adultos, linfoma no de Hodgkin en adultos, cáncer de hígado en adultos
 primario, sarcoma del tejido blando en adultos, linfoma relacionado con el SIDA, tumores
 malignos relacionados con el SIDA, cáncer de ano, astrocitoma, cáncer de las vías biliares,
 5 cáncer de vejiga, cáncer de huesos, glioma del tallo cerebral, tumores cerebrales, cáncer de
 mama, cáncer de la pelvis renal y uréter, linfoma del sistema nervioso central (primario),
 linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral, cáncer
 de cuello uterino, cáncer hepatocelular infantil (primario), cáncer de hígado infantil (primario),
 leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia mieloide aguda infantil, glioma del tallo
 10 cerebral infantil, astrocitoma cerebeloso infantil, astrocitoma cerebral infantil, tumores de
 células germinales extracraneales infantiles, enfermedad de Hodgkin infantil, linfoma de
 Hodgkin infantil, glioma de la vía óptica y e hipotalámico infantil, leucemia linfoblástica
 infantil, meduloblastoma infantil, linfoma no de Hodgkin infantil, tumores neuroectodérmicos
 primitivos supratentoriales y pineales infantiles, cáncer de hígado primario infantil,
 15 rabdomiosarcoma infantil, sarcoma del tejido blando infantil, glioma hipotalámico y de la vía
 óptica infantil, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer de colon,
 linfoma de células T cutáneo, carcinoma de células de los islotes del páncreas endocrino,
 cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer epitelial, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing
 y tumores relacionados, cáncer de páncreas exocrino, tumor de células germinales
 20 extracraneales, tumor de células germinales extragodanales, cáncer de las vías biliares
 extrahepáticas, cáncer de ojo, cáncer de mama en la mujer, enfermedad de Gaucher,
 cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumores
 gastrointestinales, tumores de células germinales, tumor trofoblástico gestacional,
 tricoleucemia, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, enfermedad de Hodgkin,
 25 linfoma de Hodgkin, hipergammaglobulinemia, cáncer hipofaríngeo, cánceres intestinales,
 melanoma intraocular, carcinoma de células de los islotes, cáncer pancreático de células de
 los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de labio y cavidad
 oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, trastornos linfoproliferativos, macroglobulinemia,
 30 cáncer de mama en el hombre, mesotelioma maligno, timoma maligno, meduloblastoma,
 melanoma, mesotelioma, cáncer metastásico escamoso de cuello con primario oculto,
 cáncer metastásico escamoso de cuello primario, cáncer metastásico escamoso de cuello,
 mieloma múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, síndrome
 mielodisplásico, leucemia mielógena, leucemia mieloide, trastornos mieloproliferativos,
 35 cáncer de seno paranasal y cavidad nasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no
 de Hodgkin durante el embarazo, cáncer de piel no melanoma, cáncer de pulmón de células
 no pequeñas, cáncer metastásico escamoso de cuello con primario oculto, cáncer

bucofaríngeo, osteosarcoma-Z fibroso maligno, osteosarcoma-W histiocitoma fibroso maligno, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales de ovario, tumor de bajo potencial maligno de ovario, cáncer pancreático, paraproteinemias, púrpura, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, feocromocitoma, tumor hipofisario, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, linfoma del sistema nervioso central primario, cáncer de hígado primario, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células renales, cáncer de pelvis renal y uréter, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer de las glándulas salivares, sarcoidosis, sarcomas, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de intestino delgado, sarcoma del tejido blando, cáncer de cuello escamoso, cáncer de estómago, tumores pineales y neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, linfoma de células T, cáncer testicular, timoma, cáncer tiroideo, cáncer de la pelvis renal y uréter de células de transición, cáncer de pelvis renal y uréter de transición, tumores trofoblásticos, cáncer de células de uréter y pelvis renal, cáncer de uretra, cáncer de útero, sarcoma de útero, cáncer de vagina, glioma hipotalámico y de la vía óptica, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom, tumor de Wilms y cualquier otra enfermedad hiperproliferativa, además de neoplasia, ubicada en un sistema de órgano enumerado anteriormente.

La célula diana a eliminar, en particular una célula tumoral, preferiblemente una célula tumoral humana, se pone en contacto con un anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie de dichas célula. Según la presente invención, cualquier anticuerpo con capacidad de reconocimiento y de unión específica a un antígeno presente en la superficie celular tumoral, en particular de una célula tumoral humana, puede emplearse en el contexto del presente método.

Un listado no exhaustivo de antígenos tumorales de acuerdo a la presente invención incluye los siguientes: MAGE, MART-1/Melan-A, gp100, dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), proteína de unión a adenosina desaminasa (ADAbp), ciclofilina b, antígeno asociado colorrectal (CRC)-0017-1A/GA733, antígeno carcinoembrionario (CEA) y sus epítomos antigénicos CAP-1 y CAP-2, etv6, aml1, antígeno específico de la próstata (PSA) y sus epítomos antigénicos PSA-1, PSA-2, y PSA-3, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), receptor de células T/cadena CD3- ζ , familia MAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), familia GAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG,

GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinasa, p53, familia MUC, HER2/neu, p2lras, RCAS1, α -fetoproteína, E-cadherina, α -catenina, 13-catenina, γ -catenina, pl2Octn, gp100Pme1117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteína de poliposis adenomatosa del colon (APC), fodrina, Conexina 37, idiotipo Ig, p15, gp75, gangliósidos GM2 y GD2, productos virales tales como proteínas del virus del papiloma humano, familia Smad de antígenos tumorales, Imp-1, P1A, antígeno nuclear codificado por EBV (EBNA)-1, glucógeno fosforilasa del cerebro, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-3, SSX-4, SSX-5, SCP-1 y CT-7, y c-erbB-2; así como antígenos asociados a leucemia linfoblástica aguda (etv6, aml1, ciclofilina b), linfoma de células B (idiotipo Ig), glioma (E-cadherina, α -catenina, 13-catenina, 7-catenina, p120ctn), cáncer de vejiga (p2lras), cáncer biliar (p2lras), cáncer de mama (familia MUC, HER2/neu, c-erbB-2), carcinoma de cuello uterino (p53, p2lras), carcinoma de colon (p2lras, HER2/neu, c-erbB-2, familia MUC), cáncer colorrectal (antígeno asociado colorrectal (CRC)-0017-1A/GA733, APC), coriocarcinoma (CEA), cáncer de células epiteliales (ciclofilina b), cáncer gástrico (HER2/neu, c-erbB-2, glucoproteína ga733), cáncer hepatocelular, linfoma de Hodgkins (Imp-1, EBNA-1), cáncer de pulmón (CEA, MAGE-3, NY-ESO-1), leucemia derivada de células linfoides (ciclofilina b), melanoma (proteína p15, gp75, antígeno oncofetal, gangliósidos GM2 y GD2, Melan-A/MART-1, cdc27, MAGE-3, p2lras, gp100Pme1117), mieloma (familia MUC, p2lras), carcinoma de pulmón de células no pequeñas (HER2/neu, c-erbB-2), cáncer nasofaríngeo (Imp-1, EBNA-1), cáncer de ovarios (familia MUC, HER2/neu, c-erbB-2), cáncer de próstata (antígeno específico de la próstata (PSA) y sus epítomos antigénicos PSA-1, PSA-2 y PSA-3, PSMA, HER2/neu, c-erbB-2, glucoproteína ga733), cáncer renal (HER2/neu, c-erbB-2), cánceres de células escamosas del cuello uterino y del esófago (productos virales tales como proteínas del virus del papiloma humano), cáncer de testículos (NY-ESO-1) y leucemia de células T (epítomos del VLTH-1).

En una segunda etapa, que transcurre de modo simultáneo con respecto a la primera etapa anterior, el método de eliminación de una célula diana de acuerdo a la presente invención, en donde dicha célula diana es preferiblemente una célula tumoral, comprende poner en contacto dicha célula diana con una composición que comprende proteínas del sistema del complemento con capacidad de inducir lisis de células que presentan un anticuerpo unido a su superficie.

En una realización particular, las proteínas del sistema del complemento son exógenas con respecto a la célula diana a eliminar.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie de una célula tumoral diana y de una composición que comprende proteínas del sistema del complemento con capacidad de

inducir lisis de células que presentan un anticuerpo unido a su superficie para preparar un medicamento para el tratamiento del cáncer que comprende dicha célula tumoral diana, en donde el anticuerpo específico y la composición que comprende proteínas del sistema del complemento se administran al paciente de forma simultánea.

5 Alternativamente, la invención se refiere a un anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie de una célula tumoral diana y una composición que comprende proteínas del sistema del complemento con capacidad de inducir lisis de células que presentan un anticuerpo unido a su superficie para el tratamiento de un cáncer que comprende dicha célula tumoral diana en un paciente, en donde el anticuerpo específico y la
10 composición que comprende proteínas del sistema del complemento se administran al paciente de forma simultánea.

Alternativamente, la invención se refiere a un método para el tratamiento de un cáncer que comprende una célula tumoral diana, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo específico de un antígeno presente en
15 la superficie de una célula tumoral diana y de una composición que comprende proteínas del sistema del complemento con capacidad de inducir lisis de células que presentan un anticuerpo unido a su superficie de forma simultánea.

La expresión “cantidad terapéuticamente efectiva”, en relación al anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie de una célula tumoral diana y de una composición
20 que comprende proteínas del sistema del complemento, hace referencia a la cantidad de dicho anticuerpo o de dicho complemento que se requiere para lograr una prevención, curación, retraso, reducción de la gravedad o mejora de los síntomas asociados al cáncer.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados
25 en ningún caso como limitativos del alcance de la misma.

EJEMPLO 1

Immunoablación de células germinales primordiales (CGP) de pollo

30

Síntesis del procedimiento

Los embriones que se desea preparar para su utilización como receptores de trasplantes de CGP con el fin de construir quimeras germinales aviares son tratados sucesivamente con un anticuerpo frente a un antígeno de superficie presente en las células
35 germinales primordiales seguido de la aplicación de complemento sérico exógeno,

preferiblemente de conejo. Alternativamente, puede lograrse una ablación parcial de la población de CGP del embrión receptor aplicando únicamente el complemento sérico, que se activará por vías distintas de la vía clásica de activación del complemento. Los tratamientos pueden aplicarse en diversos momentos previos a la migración y colonización gonadal por las CGP. La vía de administración del tratamiento varía según el momento del desarrollo en que se aplique, pudiendo utilizarse la inyección subgerminal, o la aplicación sobre membrana perivitelina. Tras un tiempo de reacción en el que el anticuerpo (Ac) se liga a su antígeno (Ag), produciéndose así el inmunomarcaje, se aplica una dosis de complemento sérico por igual vía que el Ac. Tras eliminar el exceso de complemento, si procede, los embriones se incuban a término en cáscara nodriza, según procedimientos habituales, tal como el descrito por Perry (Perry MM 1988 Nature 331(6151): 70-72).

Los embriones así tratados, llevados a término mediante cultivo en cáscara nodriza, muestran una ausencia total de células germinales en sus gónadas, por lo que constituyen receptores ideales para el injerto de células germinales primordiales conservadas *ex situ* que deseen propagarse mediante quimeras de línea germinal. Aplicando este procedimiento se logra un elevado grado de quimerismo y un elevado porcentaje de transmisión del genotipo transplantado, sea este una estirpe o una especie en peligro de extinción o una cepa genéticamente modificada por el procedimiento que fuere y con los fines de investigación, propagación o conservación. En comparación con los métodos clásicos, de radiación o farmacológicos, este procedimiento, que no afecta a la viabilidad de los embriones tratados, redundará en una mejora de la supervivencia y con ello de los rendimientos en la propagación mediante quimeras de línea germinal.

Materiales

- Huevos embrionados de pollo mantenidos en condiciones adecuadas de temperatura y humedad desde su puesta. Se limpian con alcohol o con una solución de hipoclorito sódico 30 o 60 minutos antes de su uso.
- Placas Petri desechables de 100 mm de diámetro, o vidrios de reloj o cristalizadores de dimensiones similares para exponer y manipular el embrión
- Anticuerpo específico para el marcaje de las CGP (p.e. anti-SSEA1, DHSB), diluido inmediatamente antes de su uso en PBS con un 1% de BSA u otro agente bloqueante que limite la unión in específica del Ac.
- Complemento de conejo fetal o conejo recién nacido, mantenido a -80 °C y descongelado y diluido inmediatamente antes de su uso.
- PBS estéril mantenido a temperatura ambiente

- Piezas cuadradas (1 cm x 1 cm, aproximadamente) de parafilm u otro material hidrófobo que tenga baja adherencia a la membrana perivitelina y otras estructuras del huevo.
- Pañuelos de celulosa, preferiblemente estériles, para limpieza del albumen que rodea al disco germinal
- Micropipetas capilares para inyección, con diámetros externo e interno de 80 y 60 micras aproximadamente.
- Materiales para el cultivo de embriones en cáscara nodriza: cáscaras, láminas de polietileno, albumen fluido, antibióticos, coronas para cierre, etc.

10

Instalaciones y equipos

Las manipulaciones que a continuación se describen pueden hacerse en campana de flujo o en un ambiente limpio y sin corrientes de aire.

- Microinyector capaz de dosificar 5-10 μ l a baja velocidad y presión.
- Lupa binocular con magnificación 5-20, con fuente de luz fría incidente.
- Incubadora de huevos con ángulos de volteo automático adecuados para el cultivo de embriones en cáscara nodriza.
- Estufa convencional para incubación de los embriones a 37 °C tras las aplicaciones de Ac y complemento.

20

1.1. Aplicación en membrana perivitelina

En este procedimiento los tratamientos se aplican directamente sobre la membrana perivitelina que cubre al disco germinal, de modo que Ac y Complemento han de difundir a través de dicha membrana hasta alcanzar las diferentes capas celulares del embrión. El embrión puede encontrarse en cualquier estadio de desarrollo anterior a HH 5.

25

Metodología

- Se abre el huevo embrionado vertiendo el contenido sobre una de las cápsulas Petri. Se voltea las veces que sea necesario hasta que el disco germinal quede bien expuesto en el polo superior de la yema. Se usan preferiblemente recipientes de concavidad poco marcada, para que la yema no quede sumergida en el albumen y el disco germinal sea accesible, pero de paredes altas (2 cm o más) para que la tapa no toque en el embrión.
- Con un pañuelo de celulosa se despeja de albumen el disco germinal. Para ello se dobla el pañuelo; la arista de doblez se pone en contacto con el albumen en las

35

- proximidades de disco germinal, pero siempre fuera de él, y se desplaza el pañuelo hacia afuera arrastrando con él el albumen. Se repite la operación las veces que sea preciso en todo el contorno del disco germinal, hasta que aparezca una oquedad bien marcada en la fina capa de albumen que cubre el disco. Cuando todo el disco germinal esté libre de albumen puede aplicarse el tratamiento.
- 5
- Se pipetea la solución de Ac, en volumen suficiente para cubrir completamente la oquedad hecha en torno al disco germinal (entre 50 y 100 µl). Si el disco ha quedado en el polo superior, la solución de Ac quedará formando una gota de varios mm de altura.
- 10
- La solución de Ac aplicada sobre el disco germinal se cubre con una pieza de parafilm. Aunque parte de la solución dispensada escurre, el resto queda protegido frente a pérdidas por evaporación durante la incubación.
 - Se tapa el recipiente, de modo que la tapa no contacte con el disco germinal, y se introduce en la estufa de incubación, a 37 °C y saturada de humedad, durante 1
- 15
- Pasado este tiempo se retira el embrión de la estufa. Se levanta la pieza de parafilm, con cuidado de no dañar el disco germinal o la membrana perivitelina (si se observan adherencias, lávense con chorros abundantes de PBS hasta que se desprendan). Se hacen tres lavados con PBS.
- 20
- Se aplica la solución de complemento, recién descongelado y diluido, de manera semejante a como se aplicó el Ac, y se cubre con parafilm.
 - Se tapa y se incuba en estufa durante 1 h.
 - Se retira de la estufa y se lava el complemento como anteriormente se hizo con el Ac.
- 25
- Se monta el embrión para cultivo en sistema II según Perry (Perry MM 1988 Nature 331(6151): 70-72) y se pone en incubadora.

Resultados

En el análisis de los resultados de la supervivencia, los inventores evalúan el desarrollo temprano cuando al día siguiente de aplicado el tratamiento, se constata un avance del mismo y desarrollo tardío cuando a término el desarrollo del embrión ha sido normal, basándonos en si a los 4 días hemos constatado desarrollo de membranas, latido cardíaco, árbol vascular. Los resultados obtenidos mediante el procedimiento de aplicación sobre el disco germinal se muestran en la Tabla 1.

35

Tabla 1. Número de embriones en desarrollo temprano y tardío siguiendo el procedimiento de aplicación en membrana perivitelina

Tratamiento Anticuerpo/Complemento	Nº de embriones	Desarrollo temprano	Desarrollo tardío	Nº de días
Ac-/comp-	9	6 (67%)	5 (56%)	4,7
Ac-/comp+	8	8 (100%)	7 (88%)	5,4
Ac10/comp+	12	8 (67%)	5 (58%)	4,5
Ac100/comp+	11	11 (100%)	9 (82%)	4,8
Ac1000/comp+	10	9 (90%)	9 (90%)	4,9
TOTAL	50	42 (84%)	37 (90%)	4,9

Los porcentajes de desarrollo temprano (entre un 100% y 67%) y tardío (entre un 90 y 56%) no están afectados, sí se comparan los grupos de tratamientos con el grupo control. Tampoco se ven diferencias en el número de días de supervivencia entre los grupos de embriones tratados y los controles.

Respecto al número de células germinales primordiales, los resultados se muestran a continuación en la Tabla 2.

10

Tabla 2. Número de embriones de células no contables siguiendo el procedimiento de aplicación en membrana perivitelina

Tratamiento Anticuerpo/Complemento	Cientos células (nº de embriones células no contables)	Nº de embriones sin células
Ac-/comp-	3/4 (75%)	0
Ac-/comp+	0	4/6 (67%)
Ac10/comp+	0	2/4 (50%)
Ac100/comp+	0	5/8 (63%)
Ac1000/comp+	3/9 (33%)	5/9 (56%)

En 3/4 embriones controles las CGP se contabilizan por cientos tras la inmunohistoquímica de SSEA1 (factor que se expresa en la superficie de las CGP en el momento de migración para asentarse en las gónadas), mientras que en las dos concentraciones más elevadas de anticuerpo (1/10 y 1/100) no se encuentra ningún embrión con tal número de células. En la máxima dilución (1/1000) sólo 3/9 los embriones tienen CGP por cientos lo que demuestra una acción dosis-efecto.

20

Lo mismo ocurre en los embriones en los cuales es factible contabilizar las células, a medida que aumenta la concentración de anticuerpo va disminuyendo el número de células, tal como se muestra a continuación en la Tabla 3.

5 Tabla 3. Número de embriones de células contables siguiendo el procedimiento de aplicación en membrana perivitelina

Tratamiento Anticuerpo/Complemento	Nº de embriones células contables	Media número de células
Ac-/comp-	1/4 (25%)	50
Ac-/comp+	2/6 (33%)	30
Ac10/comp+	2/4 (50%)	32
Ac100/comp+	3/8 (38%)	30
Ac1000/comp+	1/9 (11%)	12

Los inventores realizaron una segunda inmunohistoquímica de otro factor específico de las CGP de pollo, en esta segunda inmunohistoquímica se emplea un anticuerpo específico anti-vasa de pollo (DDX4) (VC4, cedido por el Dr B Pain, IMSERM U846 – Lyon, Francia), constatando la presencia de CGP en el grupo en el que sólo se usó complemento y corroborando la ausencia de las células en los embriones tratados.

1.2. Aplicación subgerminal

15 En este procedimiento los tratamientos se aplican mediante inyección subgerminal. Está indicado cuando los embriones se encuentran en estadios X-XII. Los volúmenes que pueden inyectarse en la cavidad son inferiores a 10 µl, por lo que las diluciones de Ac y Complemento que se manejan serán muy bajas (altas concentraciones).

20 Metodología

- Se abre el huevo embrionado vertiendo el contenido sobre una de las cápsulas Petri. Se voltea las veces que sea necesario hasta que el disco germinal quede bien expuesto en el polo superior de la yema. Se usan preferiblemente recipientes de concavidad poco marcada, para que la yema no quede sumergida en el albumen y el disco germinal sea accesible, pero de paredes altas (2 cm o más) para que la tapa no toque en el embrión.
- Se carga la micropipeta con un volumen de solución de Ac mayor que el que se desee inyectar.

- Se inserta la micropipeta bajo el disco germinal. Con el disco germinal en el polo superior, la micropipeta debe incidir casi horizontalmente en la parte más exterior de la zona pelúcida. La membrana perivitelina formará una ligera depresión al contacto con la punta de la micropipeta, lo que se verá como un leve cambio de en ese punto.
5 Se sabe que la punta perfora la membrana porque esa depresión y cambio de brillo desaparecen. A partir de ese momento se avanza la punta de la pipeta 1 ó 2 mm y se alcanza la cavidad subgerminal.
- Se inyecta el volumen deseado (no más de 10 μ l), asegurándose de no inyectar aire en la cavidad subgerminal. Ha de tenerse en cuenta que con los inyectores
10 neumáticos el avance del líquido puede tener una inercia apreciable. Si la solución se ha marcado con algún colorante podrá comprobarse más fácilmente el avance del líquido y la correcta localización de lo inyectado
- Se retira la micropipeta desplazándola horizontalmente. En ocasiones puede haber un ligero reflujo del líquido hacia afuera a través de orificio de punción.
- 15 - Se tapa el recipiente, de modo que la tapa no contacte con el disco germinal, y se introduce en la estufa de incubación, a 37 °C y saturada de humedad, durante 1 hora.
- Se retira el embrión de la estufa. Se realiza una segunda inyección, en iguales condiciones que la primera, con complemento recién descongelado y diluido.
- 20 - Se tapa y se incuba en estufa durante 1 hora.
- Se retira de la estufa y se monta el embrión para cultivo en sistema II según Perry (Perry MM 1988 Nature 331(6151): 70-72) y se pone en incubadora. Alternativamente, puede montarse el embrión en sistema II de Perry inmediatamente después de aplicado el complemento. Haciendo la incubación de 1 h antes de
25 montarlo da la oportunidad de revisar la correcta integridad del disco germinal después de las dos inyecciones.

Resultados

El desarrollo tardío y el número de días de los embriones, tanto en el grupo control
30 como en el que se aplica sólo el complemento, es igual al de los controles de la aplicación en disco germinal, indicando que el acto de inyectar no afecta al desarrollo de los embriones. Sin embargo, cuando el anticuerpo se aplica a 1/100 el desarrollo tardío baja hasta un 40% frente al 82% de los embriones que se desarrollan cuando el mismo tratamiento se aplica en el disco germinal. Este efecto es devastador cuando se aplica el
35 anticuerpo y el complemento a la vez.

Tabla 4. Número de embriones en desarrollo temprano y tardío siguiendo el procedimiento de aplicación subgerminal

Tratamiento Anticuerpo/Complemento	Nº de embriones	Desarrollo temprano	Desarrollo tardío	Nº de días
Ac-/comp-	15	12	9	4,7
Ac-/comp+	13	8	8	4
Ac100/comp+	7	6	3 (40%)	3,7
Ac1000/comp+	4	4	4	3,7
Ac10000/comp+	6	5	5	4,7
Cocktail	4	3	0	0
TOTAL	49	38	29	4,3

REIVINDICACIONES

- 5
1. Un método de eliminación de células germinales primordiales en un embrión de un ave que comprende:
- poner en contacto las células germinales primordiales del embrión con un anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie celular de dichas células germinales primordiales, y
 - poner en contacto, bien a continuación o bien simultáneamente con respecto a la
- 10
- etapa anterior, las células germinales primordiales con una composición que comprende proteínas del sistema del complemento con capacidad de inducir lisis de células que presentan un anticuerpo unido a su superficie.
- 15
2. El método según la reivindicación anterior, en donde la puesta en contacto con el anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie celular de dichas células germinales primordiales se lleva a cabo en un estadio del desarrollo embrionario previo a la migración y colonización gonadal por parte de dichas células germinales primordiales.
- 20
3. El método según la reivindicación anterior, en donde dicho estadio de desarrollo embrionario es el estadio HH15 o un estadio anterior.
- 25
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la puesta en contacto con el anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie celular de dichas células germinales primordiales y con la composición que comprende proteínas del sistema de complemento se lleva a cabo mediante administración de dicho anticuerpo específico y de dicha composición que comprende proteínas del complemento mediante aplicación subgerminal, o mediante aplicación sobre membrana perivitelina.
- 30
5. El método según la reivindicación anterior, en donde la puesta en contacto con el anticuerpo específico de un antígeno presente en la superficie celular de dichas células germinales primordiales y, a continuación, con la composición que comprende las proteínas del sistema de complemento se lleva a cabo mediante
- 35
- administración de dicho anticuerpo específico y de dichas proteínas del complemento

mediante aplicación subgerminal.

- 5
6. El método según la reivindicación anterior, en donde la administración mediante aplicación subgerminal se produce entre los estadios X y XII del embrión.
7. El método según la reivindicación 4, en donde la administración mediante aplicación sobre membrana perivitelina se produce en un estadio anterior al estadio HH5 del embrión.
- 10
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde las proteínas del sistema del complemento son exógenas respecto del ave.
- 15
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo específico del antígeno presente en la superficie celular de dichas células germinales primordiales se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-SSEA1 (anti-antígeno embrionario estadio-específico 1), un anticuerpo anti-EMA-1 (anti-antígeno 1 de membrana epitelial), un anticuerpo anti-SSEA3 (anti-antígeno embrionario estadio-específico 3), un anticuerpo anti-SSEA4 (anti-antígeno embrionario estadio-específico 4), un anticuerpo anti-integrina $\alpha 6$ y un anticuerpo anti-integrina $\beta 1$.
- 20
10. El método según la reivindicación anterior, en donde el anticuerpo específico del antígeno presente en la superficie celular de dichas células germinales primordiales es un anticuerpo anti-SSEA1.
- 25
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el ave es un ave del género *Gallus*.
- 30
12. Un embrión aviar en el que se han eliminado al menos parte de las células germinales primordiales, obtenido mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 35
13. Un método de obtención de un embrión aviar quimera germinal que comprende:
- eliminar las células germinales primordiales de un embrión de una primera ave mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, e
 - injertar en el embrión de dicha primera ave células germinales primordiales

obtenidas a partir del embrión de una segunda ave.

14. El método según la reivindicación anterior, en donde la segunda ave es un ave en peligro de extinción o es un ave transgénica.

5

15. Un embrión aviar quimera germinal, obtenido mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14.

16. Un método de obtención de un ave quimera germinal, que comprende

10

- implantar en un embrión aviar obtenido de acuerdo con el método según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14 células germinales primordiales de un segundo ave y
- mantener el embrión obtenido en la etapa anterior en condiciones adecuadas hasta completar su desarrollo embrionario.

15

17. Un ave quimera germinal obtenida mediante un método según las reivindicaciones 13 o 14 que contiene células germinales primordiales de una segunda ave.



21 N.º solicitud: 201431678

22 Fecha de presentación de la solicitud: 14.11.2014

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **C12N15/873** (2010.01)
C07K16/28 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 9838283 A1 (UNIV GUELPH et al.) 03.09.1998, todo el documento.	1-17
Y	VAN DE LAVOIR, M. C., <i>et al.</i> High-grade transgenic somatic chimeras from chicken embryonic stem cells. <i>Mechanisms of Development</i> , ELSEVIER SCIENCE IRELAND LTD, IE 2006 VOL: 123 No: 1 Pags: 31-41 ISSN 0925-4773 Doi: doi:10.1016/j.mod.2005.10.002 Wittbrodt Joachim; Volbeh Ute. Ver todo el documento.	1-17
Y	ELDER, J., <i>et al.</i> MyoD Positive Cells of the Pregastrulating Embryo are Critical for Morphogenesis and Skeletal Muscle Differentiation. <i>Society for Development Biology 64th Annual Meeting. Developmental Biology</i> , Academic Press, AMSTERDAM, NL 15.07.2005 VOL: 283 No: 2 Abs nº 302 Págs: 637 ISSN 0012-1606 Doi: doi:10.1016/j.ydbio.2005.04.040 Schlosser Gerhard. Ver todo el documento.	1-17
Y	US 2003115622 A1 (PONCE DE LEON F ABEL et al.) 19.06.2003, todo el documento, especialmente párrafos [0048],[0075]-[0130].	1-17
Y	US 2012149014 A1 (ALLMAN RICHARD et al.) 14.06.2012, todo el documento, especialmente párrafos [0065],[0169]-[0174].	1-17
A	JUNG, J. G., <i>et al.</i> Development of novel markers for the characterization of chicken primordial germ cells. <i>Stem Cells</i> , ALPHAMED PRESS, DAYTON, OH, US 01.05.2005 VOL: 23 No: 5 Págs: 689-698 ISSN 1066-5099. Ver todo el documento.	1-17

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
10.03.2015

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C07K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTUS4, TXTUS5, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, TXTCA1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, XPESP2.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.03.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 2-8, 14, 16 y 17	SI
	Reivindicaciones 1, 9-13, y 15	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-17	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 9838283 A1 (UNIV GUELPH et al.)	03.09.1998
D02	VAN DE LAVOIR, M. C., <i>et al.</i> Mechanisms of Development, ELSEVIER SCIENCE IRELAND LTD, IE 2006 VOL: 123 No: 1 Págs: 31-41 ISSN 0925-4773 Doi: doi:10.1016/j.mod.2005.10.002 Wittbrodt Joachim; Volbehr Ute.	2006
D03	ELDER, J., <i>et al.</i> Society for Development Biology 64th Annual Meeting. Developmental Biology, Academic Press, AMSTERDAM, NL 15.07.2005 VOL: 283 No: 2 Abs nº 302 Págs: 637 ISSN 0012-1606 Doi: doi:10.1016/j.ydbio.2005.04.040 Schlosser Gerhard.	15.07.2005
D04	US 2003115622 A1 (PONCE DE LEON F ABEL et al.)	19.06.2003
D05	US 2012149014 A1 (ALLMAN RICHARD et al.)	14.06.2012
D06	JUNG, J. G., <i>et al.</i> Stem Cells, ALPHAMED PRESS, DAYTON, OH, US 01.05.2005 VOL: 23 No: 5 Págs: 689-698 ISSN 1066-5099.	01.05.2005

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente describe y reivindica un método de eliminación de células germinales primordiales (CGPs) en embriones de ave, basado en poner en contacto las CGPs del embrión con un anticuerpo específico de superficie células de estas células, y, simultáneamente o en una etapa posterior, poner en contacto las células y el anticuerpo con proteínas del sistema del complemento capaces de inducir lisis en aquellas células que tengan el anticuerpo unido a su superficie. La invención especifica las etapas del desarrollo en las que debe producirse este contacto, la manera de aplicación del anticuerpo (subgerminal o sobre membrana vitelina), y los antígenos de superficie frente a los que presenta especificidad el anticuerpo que se aplica (SSEA-1, EMA-1, SSEA-3, SSEA-4, integrina alfa-6 o integrina beta-1). La invención reivindica también un método de obtención de un embrión aviar quimera germinal y de un ave quimera germinal mediante la eliminación, por el método anterior, de las CGPs de un embrión receptor, el injerto en el mismo de CGPs del embrión de una segunda ave, y el desarrollo del embrión quimera así obtenido.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

Se han encontrado varios documentos en el estado de la técnica que describen métodos de detección y eliminación de células germinales primordiales y generación de embriones quimera, y que afectan la novedad de las reivindicaciones 1, 9 a 13, y 15, y la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 17 de la solicitud, según los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986 de Patentes, respectivamente, tal y como se explica a continuación.

El documento D01 se considera el más cercano del estado de la técnica. En él se describe un método para seleccionar CGPs (que en D01 denominan células de línea germinal competentes) en embriones de pollo, y el uso de las mismas para producir quimeras. En la descripción se indica que el aislamiento de estas células se realiza mediante detección de antígenos de superficie en las mismas (concretamente, SSEA 1 y EMA 1). Una vez obtenidas las células germinales, se cultivan y se inyectan en embriones de otra ave, en los que, igual que en el método de la solicitud, se han eliminado las células germinales por distintos métodos. Si bien en los ejemplos de realización de la invención en D01 se emplean métodos de eliminación de las células distintos a los de la presente solicitud, en la descripción del documento citado se indica claramente que los anticuerpos empleados para detectar los antígenos de superficie de las células germinales del embrión pueden estar unidos a un agente citotóxico, como complemento, para lisar o matar las células marcadas por el antígeno (ver página 8, líneas 22 y 23, de D01).

En consecuencia, la información divulgada en este documento del estado de la técnica referente a la eliminación de células germinales primordiales de un embrión de pollo mediante la adición de anticuerpos frente a antígenos de superficie de esas células (SSEA 1 y EMA 1) más proteínas del sistema de complemento, y la posterior inclusión de células germinales en ese embrión para generar un embrión quimera, afecta la novedad de las reivindicaciones 1, 9 a 13, y 15 de la presente solicitud, según el artículo 6 de la Ley de Patentes.

Por otra parte, el experto en la materia encontrará evidente, a partir del documento D01, la generación de un ave quimera a partir de este embrión quimera germinal, el empleo de proteínas del sistema del complemento exógenas, y la elección de un embrión de ave en peligro de extinción o de un ave transgénica, por lo que las reivindicaciones 8, 14, 16 y 17 de la solicitud no tienen actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

En cuanto a las etapas concretas en las que se produce la inyección del anticuerpo y a la forma de aplicación concreta del mismo, no se considera que aporten actividad inventiva a la solicitud, pues se trata de conceptos conocidos en el estado de la técnica, y de los datos aportados en la solicitud no se puede deducir claramente que tales condiciones supongan una mejora frente a los métodos existentes, sino que serían, más bien, meras alternativas conocidas en el campo técnico de la solicitud. Por tanto, las reivindicaciones 2 a 7 de la solicitud tampoco tendrán actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

En el documento D02, los autores describen cómo obtener células embrionarias de embrión de pollo, y cómo esas células se caracterizan por expresar los marcadores de membrana SSEA-1 y EMA-1. En una segunda etapa, las células obtenidas se inyectan en embriones "comprometidos" (en los que se han eliminado las células germinales), para obtener embriones quimera. La diferencia entre el método de D02 y el de la solicitud es la forma de eliminación de las células germinales del embrión receptor, pues en D02 no se emplea lisis mediada por el sistema del complemento. Sin embargo, la lisis por complemento es un método ampliamente conocido en el estado de la técnica. Por ejemplo, en el documento D03 se marcan células epiblasticas de embriones de pollo con anticuerpos específicos y se lisan esas células por incubación de los embriones en complemento. Así, el experto en la materia, conociendo por el documento D02 que las células germinales de embrión de pollo expresan los antígenos SSEA-1 y EMA-1, y necesitando un método para eliminarlas, encontrará evidente aplicar la información divulgada en el documento D03 y emplear anticuerpos frente a estos marcadores de superficie junto con el sistema de complemento para lisar las células de interés. De este modo, la combinación de los documentos D02 y D03 afecta la actividad inventiva de las reivindicaciones 1, 9 a 13, y 15 de la presente solicitud, según el artículo 8 de la Ley de Patentes. En cuanto al resto de las reivindicaciones de la solicitud, los argumentos expuestos anteriormente para el documento D01 permiten concluir que tampoco las reivindicaciones 2 a 8, 14, 16 y 17 cumplen el requisito de actividad inventiva, según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

En el documento D04 se describe el aislamiento de CGPs de embrión de pollo empleando los marcadores SSEA-1, y EMA-1. Tras su cultivo, las células se introducen en embriones receptores en los que se han eliminado las CGPs, y se generan embriones quimera. Por otra parte, en el documento D05 se divulga la utilidad de la lisis mediada por la combinación de anticuerpos y sistema de complemento como método de eliminación de células fetales. Como se ha explicado más arriba, el experto en la materia encontrará evidente la combinación de los documentos D04 y D05 para llevar a cabo el método de la presente solicitud, por lo que las reivindicaciones 1, 9 a 13, y 15 de la misma no tienen actividad inventiva, según el artículo 8 de la Ley de Patentes. Y, como también se ha comentado para los documentos anteriores, las reivindicaciones 2 a 8, 14, 16 y 17 resultan evidentes para el experto en la materia del campo técnico de la solicitud, por lo que estas reivindicaciones tampoco cumplen el requisito de actividad inventiva, según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

Finalmente, se cita en este informe el documento D06, por considerarlo cercano a la solicitud, ya que describe marcadores de membrana útiles para la caracterización de células germinales primordiales de pollo. Aunque en el documento se incluyen todos los marcadores reivindicados en la presente solicitud, este documento no describe métodos de eliminación de CGPs, por lo que no afecta la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud.