

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-515212

(P2004-515212A)

(43) 公表日 平成16年5月27日(2004.5.27)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 3
A 6 1 K 35/12	A 6 1 K 35/12	4 B O 6 4
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 B O 6 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 D	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 108 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2001-582527 (P2001-582527)	(71) 出願人	304004694
(86) (22) 出願日	平成13年4月19日 (2001.4.19)		アンステイテュ・ナシオナル・ドゥ・ラ
(85) 翻訳文提出日	平成14年11月11日 (2002.11.11)		・ルシエルシュ・アグロノミク
(86) 国際出願番号	PCT/FR2001/001207		フランス国、75007パリ、リユー・ド
(87) 国際公開番号	W02001/085938		ウ・リュニベルシテ、145
(87) 国際公開日	平成13年11月15日 (2001.11.15)	(71) 出願人	501455677
(31) 優先権主張番号	00/06029		サントル・ナシオナル・ドゥ・ラ・ルシエ
(32) 優先日	平成12年5月11日 (2000.5.11)		ルシユ・シアンティフィーク (セーエヌエ
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		ールエス)
			CENTRE NATIONAL DE
			LA RECHERCHE SCIENT
			IFIQUE (CNRS)
			フランス国、75794パリ・セデックス
			16、リユー・ミケランジュ、3
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改変E S細胞およびE S細胞特異的遺伝子

(57) 【要約】

本発明は、多分化能を有する場合に特異的に外来遺伝子を発現する、改変されたトリE S細胞に関する。本発明はまた、多分化能トリ細胞において特異的に発現される核酸およびポリペプチド、ならびにこの核酸およびポリペプチドを用いて細胞の多分化能を検出する方法にも関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記配列群から選択される核酸配列を含むことを特徴とする、精製または単離された核酸。

- a) 配列番号 1、または配列番号 1 のヌクレオチド 1 4 0 9 - 2 8 7 8 に対応する断片；
- b) 配列番号 1、特に配列番号 1 のヌクレオチド 3 1 1 1 - 3 6 7 0 に対応する断片から選択される配列の少なくとも 1 5 の連続したヌクレオチドの断片の配列；
- c) 最適の整列化後、a) または b) に定義された配列と少なくとも 8 0 % の同一性を有する核酸配列であり、配列番号 1 のヌクレオチド 2 3 0 8 - 2 9 2 7 または 3 0 9 4 - 3 7 5 3 により規定されるものではない配列；
- d) 高ストリンジェントな条件下で a) または b) に定義された核酸配列とハイブリダイズする核酸配列であり、配列番号 1 のヌクレオチド 2 3 0 8 - 2 9 2 7 または 3 0 9 4 - 3 7 5 3 により規定されるものではない配列；
- e) a)、b)、c) または d) に定義された配列に対応する相補的配列または R N A 配列。

【請求項 2】

配列番号 1、相補的配列またはこれらの配列のいずれかに対応する R N A 配列を含むか、あるいはこれからなることを特徴とする、請求項 1 記載の精製または単離された核酸。

【請求項 3】

配列番号 2 のタンパク質の連続した少なくとも 2 0 0 のアミノ酸の断片を有するポリペプチドをコードすることを特徴とする、精製または単離された核酸。

【請求項 4】

下記から選択されるポリペプチドを含むことを特徴とする、単離されたポリペプチド。

- a) 配列番号 2 に対応するポリペプチド；
- b) a) で定義した配列を有するポリペプチドの変異ポリペプチド；
- c) 前記 a) のポリペプチドと少なくとも 8 0 % の相同性を有する、a) または b) で定義したポリペプチドに相同的なポリペプチド；
- d) a)、b) または c) に定義したポリペプチドの少なくとも 1 5 の連続するアミノ酸の断片；
- e) a)、b) または c) に定義したポリペプチドの生物学的に活性な断片。

【請求項 5】

配列番号 2 から選択される配列、または最適の整列化後に該配列と少なくとも 8 0 % の相同性を有する配列からなることを特徴とする、請求項 4 記載のポリペプチド。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載した核酸、または請求項 4 および 5 のいずれかに記載したポリペプチドをコードする核酸を含む、クローニング及び/又は発現ベクター。

【請求項 7】

請求項 6 に記載のベクターで形質転換されたことを特徴とする宿主細胞。

【請求項 8】

外来遺伝子の導入により改変されたトリ E S 細胞であり、該外来遺伝子は該細胞が多分化能状態で維持されている時にのみ特異的に発現されることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載した核酸を含む宿主細胞。

【請求項 9】

前記外来遺伝子がレポーター遺伝子であることを特徴とする、請求項 8 記載の細胞。

【請求項 10】

前記レポーター遺伝子が、l a c Z、G F P、ルシフェラーゼ、R O S A - - g e o および抗生物質耐性に関与する遺伝子から選択されることを特徴とする、請求項 9 記載の細胞。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

外来核酸の導入により改変されたトリ細胞であり、該外来核酸が請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の核酸に組み込まれていることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の核酸を含む宿主細胞。

【請求項 1 2】

前記外来核酸が治療的有用性を有する遺伝子であり、場合により、その前に空間的 - 時間的プロモーター及び / 又はターミネーター配列を有することを特徴とする、請求項 1 1 記載の細胞。

【請求項 1 3】

前記外来核酸が遺伝的マーカーであることを特徴とする、請求項 1 1 記載の細胞。

【請求項 1 4】

前記トリがキジ (Galiformes) 目に属することを特徴とする、請求項 8 ~ 1 3 のいずれかに記載の細胞。

【請求項 1 5】

前記トリがニワトリまたはウズラであることを特徴とする、請求項 1 4 記載の細胞。

【請求項 1 6】

前記レポーター遺伝子が *ens - 1* 遺伝子のプロモーターの制御下に組み込まれていることを特徴とする、請求項 1 4 および 1 5 のいずれかに記載の細胞。

【請求項 1 7】

2000年5月11日にCollection Nationale de Cultures de Microorganismes に識別番号 I - 2477 として寄託された、9N2 . 5 細胞であることを特徴とする、請求項 1 4 および 1 5 のいずれかに記載の細胞。

【請求項 1 8】

請求項 8 ~ 1 7 のいずれかに記載の ES 細胞由来であることを特徴とする、分化したトリ細胞。

【請求項 1 9】

請求項 7 ~ 1 8 のいずれかに記載の細胞を含むことを特徴とする、ヒト以外の動物。

【請求項 2 0】

核酸配列を検出及び / 又は増幅するためのプローブまたはプライマーとしての、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の核酸配列の使用。

【請求項 2 1】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の核酸配列の、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドとしての使用。

【請求項 2 2】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の核酸配列の、組換えポリペプチドを製造するための使用。

【請求項 2 3】

請求項 7 記載の細胞を、組換えポリペプチドの発現を可能にする条件下で培養し、そして該組換えポリペプチドを回収することを特徴とする、組換えポリペプチドを得る方法。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 記載の方法を用いて得られることを特徴とする、組換えポリペプチド。

【請求項 2 5】

請求項 4、5 および 2 4 のいずれかに記載のポリペプチドを選択的に結合することを特徴とする、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体。

【請求項 2 6】

下記工程を含むことを特徴とする、請求項 4、5 および 2 4 のいずれかに記載のポリペプチドを検出する方法。

- a) 生物学的試料を請求項 2 5 記載の抗体に接触させる、
- b) 形成される抗原 - 抗体複合体を証明する。

【請求項 2 7】

10

20

30

40

50

下記を含むことを特徴とする、請求項 26 記載の方法を行うための試薬キット。

- a) 請求項 25 記載のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、
- b) 場合により、免疫反応に適した媒体を構成する試薬、
- c) 免疫反応の間に形成される抗原 - 抗体複合体を検出するための試薬。

【請求項 28】

配列番号 1 に対応する遺伝子の発現の産物、または配列番号 1 の mRNA の存在を決定することを特徴とする、トリ ES 細胞の多分化能を決定する方法。

【請求項 29】

配列番号 1 の mRNA を、請求項 20 に記載の使用により、プローブまたはプライマーを用いたノーザンブロッティングまたは RT - PCR により検出することを特徴とする、請求項 28 記載の方法。

10

【請求項 30】

配列番号 2 のタンパク質の存在を、例えば請求項 25 記載の抗体を用いて検出することを特徴とする、請求項 28 記載の方法。

【請求項 31】

請求項 1 ~ 3 のいずれかの項記載の核酸の存在をトリのゲノムにおいて検出することを特徴とする、キジ (Galiformes) 目に属するトリを分類する方法。

【請求項 32】

請求項 1 ~ 3 のいずれかの項記載の核酸の存在を食品試料において検出することを特徴とする、食品試料中のキジ (Galiformes) 目に属するトリ由来の試料の存在を決定する方法。

20

【請求項 33】

請求項 1 ~ 3 のいずれかの項記載の核酸配列を含むことを特徴とする、DNA チップ。

【請求項 34】

請求項 4、5 および 24 のいずれかの項記載のポリペプチド、または請求項 25 記載の抗体を含むことを特徴とする、タンパク質チップ。

【請求項 35】

下記工程を含むことを特徴とする、生物学的試料または食品試料中に、請求項 1 ~ 3 のいずれかの項記載の核酸を検出及び / 又は解析する方法。

a) 該試料を、標識された請求項 1 ~ 3 のいずれかの項記載のポリヌクレオチドと接触させる、

30

b) 該ポリヌクレオチドと該試料中の核酸との間に形成されたハイブリッドを検出及び / 又は解析する。

【請求項 36】

請求項 1 または 2 に記載の核酸から選択されるプライマーを用いた、試料の核酸の増幅工程を含むことを特徴とする、生物学的試料または食品試料中に請求項 1 ~ 3 のいずれかの項記載の核酸を検出及び / 又は解析する方法。

【請求項 37】

下記工程を含むことを特徴とする、多分化能を有する細胞の分化を誘導しうる物質または媒体をスクリーニングする方法。

40

a) 請求項 7 ~ 17 のいずれかの項記載の ES 細胞を、多分化能表現型を維持しうる培地中に維持し、

b) 該培地に前記物質を添加するか、または該培地を試験すべき培地で置換し、

c) 配列番号 2 のタンパク質の発現または外来遺伝子の欠如により分化の誘導を決定する。

【請求項 38】

請求項 8 ~ 17 のいずれかの項記載の細胞を用いて行うことを特徴とする、請求項 37 記載の方法。

【請求項 39】

9N2.5 細胞を用い、そして - ガラクトシダーゼの発現の欠如を検出することを特

50

徴とする、請求項 37 または 38 記載の方法。

【請求項 40】

下記工程を含むことを特徴とする、分化した細胞の多分化能を復帰させる物質をスクリーニングする方法。

- a) 分化した細胞を適宜培地中に維持し、
- b) 該培地を、多分化能表現型を維持でき、試験すべき該物質を含む培地で置換し、
- c) 該細胞中の配列番号 2 のタンパク質または外来遺伝子の発現により、該細胞の多分化能の復帰を決定する。

【請求項 41】

請求項 8 ~ 17 のいずれかの項記載の細胞由来の分化細胞を用いて行うことを特徴とする、請求項 40 記載の方法。 10

【請求項 42】

分化した 9N2.5 細胞を用い、そして - ガラクトシダーゼの発現を検出することを特徴とする、請求項 40 または 41 記載の方法。

【請求項 43】

請求項 37 ~ 42 のいずれかの項記載の方法を用いて得られることを特徴とする媒体または物質。

【請求項 44】

下記から選ばれることを特徴とする医薬品としての化合物。

- a) 請求項 1 ~ 3 のいずれかの項記載の核酸、 20
- b) 請求項 4、5 または 24 記載のポリペプチド、
- c) 請求項 6 記載のベクター、
- d) 請求項 7 ~ 17 のいずれかの項記載の細胞、
- e) 請求項 25 記載の抗体、
- f) 請求項 43 記載の物質。

【請求項 45】

配列番号 1 のヌクレオチド 3111 - 3670 に対応する核酸の、トリ多能性細胞中の有用遺伝子の特異的発現のための該有用遺伝子のプロモーターとしての使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】 30

【産業上の利用分野】

本発明は、多分化能（多能性）を有する場合に、外来遺伝子を特異的に発現する改変されたトリ ES 細胞に関する。本発明はまた、多分化能を有するトリ細胞において特異的に発現される核酸およびポリペプチド、並びにこの核酸およびポリペプチドを用いて細胞の多分化能を検出する方法に関する。

【0002】

【従来技術】

ES 細胞は、ごく初期の胚から単離された多分化能（多能性）を有する細胞であり、宿主の胚に移植された後に生殖組織を含むすべての組織の形態形成に参与しうる。これらの細胞はまずマウスで単離され、マウスにおいて、そのゲノムの高度に標的化された改変を有する突然変異動物の作製に非常に広範に用いられている。ES 細胞は鳥類において既に単離され性状決定されている（Pain et al., 1996）。これらの細胞はニワトリの遺伝の改変に使用することができる（Echtes et al., 1996, Pain et al., 1999）。これらのトリ細胞の多分化能を維持することを可能にする培地は特許出願 WO 96 / 12793 の主題であった。 40

【0003】

培養状態で ES 細胞を単離しようとする者が遭遇する困難は、これらの細胞およびその多分化能の迅速な同定に関する。いくつかの細胞性マーカー、例えばアルカリホスファターゼ活性の発現（Strickland et al., 1989）、抗原性エピトープの発現（Kelmer et al., 1981, Solter and Knowles, 50

1978)、OCT-3 などの特異的タンパク質の発現 (Rosner et al., 1990) またはテロメラーゼ活性の発現 (Prowse and Greider, 1995) が使用されてきた。これまでマウスにおいて、特にOct-3、REX-1 およびUTF-1 タンパク質が同定された。多分化能の最終的確認は、宿主胚に移植された後のこれらの細胞の形態形成能を分析することに基づき、これは非常に面倒な試験である。

【0004】

ES細胞の培養において遭遇する別の困難は、弱くかつ十分な程度の不均一性を有する細胞集団が得られること、および非多能性細胞の培養における増殖の制御の問題を含む。事実、ある特定の問題は、ある分化細胞種がよく生じる、すなわち細胞がその分化またはそのプログラムされた細胞死を誘導することにより培養物からES細胞を除去しうることに関連している。

10

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、多分化能を有する細胞により特異的および選択的に発現される核酸配列 (ens-1 遺伝子) を明かにすることにより培養中のトリ細胞の多分化能の同定を簡便にすることを提案する。

【0006】

【課題を解決するための手段】

従って、本発明の主題は、以下の配列の群から選択される核酸配列を含むことを特徴とする核酸である。

20

- a) 配列番号1、または配列番号1のヌクレオチド1409-2878に対応する断片；
- b) 配列番号1、特に配列番号1のヌクレオチド3111-3670に対応する断片から選択される配列の少なくとも15の連続したヌクレオチドの断片の配列；
- c) 最適の整列化後に、a)またはb)に定義した配列と少なくとも80%の同一性を有する核酸配列であり、配列番号1のヌクレオチド2308-2927または3094-3753により規定されるものではない配列；
- d) 高ストリンジェントな条件下でa)またはb)に定義した核酸配列とハイブリダイズする核酸配列であり、配列番号1のヌクレオチド2308-2927または3094-3753により規定されるものではない配列；
- e) a)、b)、c)またはd)に定義された配列に対応する相補的配列またはRNA配列。

30

【0007】

好ましくは、配列番号1の2773位に存在する塩基は「t」であり、従って対応するコドンはトレオニンをコードする。

c)に定義された本発明の核酸配列は、最適の整列化後、上記a)またはb)に定義された配列と少なくとも80%、好ましくは90%、最も好ましくは98%の同一性を有する。

【0008】

本明細書において同等に用いられる、「核酸」、「核酸配列」、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド配列」および「ヌクレオチド配列」なる用語は、改変されていなくてもよい、一連のヌクレオチドを意味し、異常なヌクレオチドを含んでいなくてもよく、そしてまた二本鎖DNA、一本鎖DNAおよび該DNAの転写産物に同等に対応してもよい、核酸の断片または領域を規定するのを可能にする。従って、本発明の核酸配列はPNA(ペプチド核酸)なども含む。

40

【0009】

本発明が天然の染色体環境における、すなわち天然の状態のヌクレオチド配列に関するものでないことを理解すべきである。それらは、単離及び/又は精製された、すなわち、例えば複製により直接的または間接的に採取され、それらの環境は少なくとも部分的に改変

50

されたものであるような、配列である。従って、化学合成により得られる核酸も含まれる。

【0010】

本発明の目的にとって、2つの核酸またはアミノ酸配列の間の「同一性 (%)」なる用語は、最良の整列化後に得られる、比較すべき2つの配列間で同じであるヌクレオチドまたはアミノ酸残基の割合を意味し、この割合は純粋に統計的であり、2つの配列間の違いはランダムにその全長にわたり分布する。「最良の整列化」または「最適の整列化」は、以下のようにして決定する同一性が最も高い整列化を意味する。2つの核酸またはアミノ酸配列間の配列比較は、それらを最適に整列させた後これらの配列を比較することにより慣用の方法で行われ、この比較は配列類似性を有する局部的領域を同定し比較するために、セグメントによりまたは「比較ウィンドウ」により行われる。比較のための配列の最適整列化は、手作業の他、Smith および Waterman (1981) の局所相同性アルゴリズム、Neddlmann および Wunsch (1970) の局所相同性アルゴリズム、Pearson および Lipman (1988) の類似性調査法、これらのアルゴリズムを用いたコンピュータープログラム (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) の GAP, BESTFIT, BLASTP, BLASTN, FASTA および TFASTA) により行うことができる。最適の整列化を得るには、BLOSUM 62 マトリックスを有する BLAST プログラムが好ましく使用される。PAM または PAM 250 マトリックスも使用できる。

10

20

【0011】

2つの核酸またはアミノ酸配列間の同一性 (%) は、最適に整列化したこれらの2つの配列を比較することにより決定され、比較されるべき核酸またはアミノ酸配列は、これら2つの配列間に最適整列化のための参照配列に対しておそらく付加または欠失を含む。同一性 (%) は、ヌクレオチドまたはアミノ酸残基が2つの配列間で同一である同一位置の数を決定し、この同一位置の数を比較する全位置数で割り、そして得られた数を100倍して、これら2つの配列間の同一性の割合を得ることにより算出する。

【0012】

「最適の整列化後に参照配列と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは98%の同一性を有する核酸配列」なる表現は、参照核酸配列と比較した場合にある種の改変、例えば特に欠失、短縮、伸長、キメラ的融合及び/又は置換(特に点での)を有する核酸配列であり、その核酸配列が最適の整列化後に参照核酸配列と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは98%の同一性を有する核酸配列を意味する。それらは好ましくは、その相補的配列が本発明の配列番号1の配列と特異的にハイブリダイズしうる配列である。好ましくは、特異的または高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、2つの配列の一方と、他方に相補的な配列との間で、最適の整列化後に、少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは98%の同一性を確実にするようなものである。

30

【0013】

高ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションとは、温度およびイオン強度の条件が、2つの相補的 DNA 断片間のハイブリダイゼーションが維持されることを可能にするように選択されることを意味する。実例として、上記したポリヌクレオチド断片を規定する目的の、ハイブリダイゼーション工程のための高ストリンジェントな条件は有利には以下の通りである。

40

【0014】

DNA - DNA または DNA - RNA ハイブリダイゼーションは2つの工程において行われる：(1) $5 \times \text{SSC}$ ($1 \times \text{SSC}$ は $0.15 \text{ M NaCl} + 0.015 \text{ M}$ クエン酸ナトリウムの溶液に相当する)、50%ホルムアミド、7%トデシル硫酸ナトリウム (SDS)、10×デンハート溶液、5%デキストラン硫酸および1%サケ精子 DNA

50

を含むリン酸塩緩衝液 (20 mM, pH 7.5) 中 42 で3時間の予備ハイブリダイゼーション、(2) プローブの長さに応じた温度 (すなわち、プローブ > 100ヌクレオチド長に対して42) での20時間のハイブリダイゼーション自体、次いで2 × SSC + 2% SDS 中20 で20分間の洗浄2回、および 0.1 × SSC + 0.1% SDS 中20 で20分間の洗浄1回。最後の洗浄を 0.1 × SSC + 0.1% SDS 中、プローブ > 100ヌクレオチド長に対して60 で30分間行う。規定の長さのポリヌクレオチドに対する上記高ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、Sambrook et al., 1989の教示に従って、より長いまたは短いオリゴヌクレオチドに対して当業者により調整できる。

【0015】

10

最適の整列化後、本発明の配列と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは98%の同一性を有する核酸配列の中で、配列番号1またはその断片の変異体である核酸配列、すなわち対立遺伝子性変異体、すなわち配列番号1の配列の個々の変異体、に対応するすべての核酸配列もまた好ましい。これらの自然突然変異配列は鳥類、特にキジ類 (gariform) に存在する多型に相当する。好ましくは本発明は、突然変異により配列番号1の正常配列によりコードされるポリペプチドまたはその断片のアミノ酸配列の改変を生じている変異核酸配列に関する。

【0016】

「変異核酸配列」なる表現はまた、そのcDNAが配列番号1の配列を有するゲノム核酸配列のスプライス部位の突然変異及び/又は変異から生じる任意のRNAまたはcDNAも意味する。

20

【0017】

本発明は好ましくは、配列番号1の配列、その相補的配列、または配列番号1に対応するRNA配列を含むかまたはそれからなることを特徴とする、精製または単離された本発明の核酸配列に関する。

【0018】

好ましくは、本発明の核酸配列にハイブリダイズする、またはこの核酸配列に相同性の断片は、体系的配列決定により得られ、それに関する何らのデータ、特に機能のデータが提供されていないEST (Genbank 番号 AJ397754 およびAJ393785) にほぼ対応する配列番号1のヌクレオチド2308-2927または3094-3753により規定されるものではない。。このため、これらの開示は、偶然の開示であると考えられるべきである。

30

【0019】

本発明の核酸配列を含むことを特徴とするプローブまたはプライマーもまた本発明の一部である。

従って、本発明はまた、特に、変異核酸配列を実証または区別すること、あるいは、そのcDNAが配列番号1で表される遺伝子のゲノム配列を、特にPCR法もしくは関連方法などの増幅方法を用いて同定することを可能にする、本発明のプライマーまたはプローブに関する。

【0020】

40

本発明はまた、核酸配列を検出、同定、解析及び/又は増幅するためのプローブまたはプライマーとしての、本発明の核酸配列の使用に関する。

本発明はまた、本発明の核酸配列の、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドとしての使用にも関する。

【0021】

本発明によれば、核酸配列を検出、同定、解析または増幅するための方法においてプローブまたはプライマーとして使用できるポリヌクレオチドは長さが最小15塩基、好ましくは20塩基、またはさらに好ましくは25~30塩基である。

【0022】

本発明のプローブおよびプライマーは、検出可能な、及び/又は定量可能なシグナルを得

50

るために、当業者に周知の方法を用いて放射性または非放射性化合物で直接または間接的に標識してもよい。

【0023】

標識されていない本発明のポリヌクレオチド配列をプローブまたはプライマーとして直接使用することもできる。

一般的には多くの用途に使用できる配列を得るために配列を標識する。本発明のプライマーまたはプローブは放射性要素または非放射性分子で標識する。

【0024】

使用される放射性同位体には、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、 ^3H または ^{125}I が挙げられる。非放射性の物質は、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジンまたはジオキシゲニン (dioxigenin) などのリガンド、ハプテン、染料および発光試薬 (放射発光、化学発光、生物発光、蛍光または燐光試薬など) から選ばれる。

【0025】

従って、本発明のポリペプチドは、特に PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 手法 (Rolfset al., 1991) を用いる方法においてプライマー及び/又はプローブとして使用することができる。この手法では、増幅すべき断片の境を設けるオリゴヌクレオチドプライマー対を選ぶことが必要である。例えば、米国特許第4,683,202号に記載の手法が例示される。増幅断片は、例えば、アガロースもしくはポリアクリルアミドゲル電気泳動の後、またはゲル濾過やイオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー手法の後に同定し、次いで配列決定できる。増幅の特異性は、プライマーとして本発明ポリヌクレオチドの核酸配列を用い、マトリックスとしてこれらの配列を含むプラスミドあるいは誘導された増幅産物を用いて調節できる。増幅されたヌクレオチド断片は、生物学的試料中の、この増幅ヌクレオチド断片の配列に相補的な配列の標的核酸の存在を実証するために、ハイブリダイゼーション反応における試薬として使用できる。

【0026】

本発明はまた、本発明のプライマーを用いた増幅により得ることができる核酸にも関する。

標的核酸を増幅するその他の手法を、本発明のヌクレオチド配列を有するプライマー対を用いる PCR法 (PCR変法) の代わりとして有利に用いることができる。「PCR変法」なる用語は、核酸配列の直接または間接的再生産を用いる、あるいは標識系が増幅されたすべての方法を意味する。これらの方法は当然既知である。一般的に、それらはDNAのポリメラーゼによる増幅を含み、もとの試料がRNAである場合は逆転写を予め実施しておくべきである。かかる増幅には現在、非常に多くの方法が存在し、例えば、SDA (strand displacement amplification、鎖置換増幅) 法 (Walker et al., 1992)、Knoh et al., (1989) により既報のTAS (transcription-based amplification system、転写に基づく増幅系) 法、Guatelli et al. (1990) により既報の3SR (self-sustained sequence replication、自立配列複製) 法、Kievitis et al. (1991) により既報のNASBA (nucleic acid sequence based amplification、核酸配列に基づく増幅) 法、TMA (transcription mediated amplification、転写媒介増幅) 法、Landegren et al. (1988) により既報のLCR (ligase chain reaction、リガーゼ連鎖反応) 法、Segev (1992) により既報のRCR (repair chain reaction、修復連鎖反応) 法、Duck et al. (1990) により既報のCPR (cycling probe reaction、循環プローブ反応) 法およびMiele et al. (1983) により既報のQ-ベータ-レプリカーゼ増幅 (Q-beta-replicative amplification) 法がある。これらの手法のいくつかはこれまで改善されている。

10

20

30

40

50

【0027】

検出すべき標的ポリヌクレオチドが mRNA である場合は、生物学的試料中に含まれる mRNA から cDNA を得るために、本発明のプライマーを用いて増幅反応を行うか、または本発明のプローブを用いる検出法を実施する前に、逆転写酵素型の酵素が有利に使用される。次いで、得られる cDNA は、本発明による増幅または検出方法に用いるプライマーまたはプローブの標的として働く。

【0028】

プローブハイブリダイゼーション手法は多くのやり方で実施できる (Matthews et al., 1988)。最も一般的な方法は、各種の組織の細胞、または培養中の細胞から抽出した核酸を支持体 (ニトロセルロース、ナイロンまたはポリスチレンなど) に固定し、固定した標的核酸を規定の条件下でプローブと共にインキュベートすることからなる。ハイブリダイゼーション後、過剰のプローブを除去し、形成されたハイブリッド分子を適宜方法 (プローブに結合した放射能、蛍光または酵素活性の測定) を用いて検出する。

10

【0029】

本発明の核酸プローブの別の態様によれば、これは捕捉プローブ (capture probe) として使用できる。この場合、「捕捉プローブ」と称されるプローブは、支持体上に固定され、特異的ハイブリダイゼーションにより、試験すべき生物学的試料から得られる標的核酸を捕捉するのに使用され、次いで標的核酸を、容易に検出する要素で標識した「検出プローブ」と称される第2のプローブを用いて検出する。

20

【0030】

従って、有利な核酸断片には、特にアンチセンスオリゴヌクレオチド、すなわち、その構造が、標的配列とのハイブリダイゼーションにより対応する産物の発現の阻害を確実にするようなオリゴヌクレオチドが挙げられる。また、対応する産物の発現の調節に参与するタンパク質と相互作用することにより、この発現の阻害または活性化を生じるセンスオリゴヌクレオチドも例示される。

【0031】

本発明のある特定の態様では、本発明の核酸は配列番号2のタンパク質の少なくとも200アミノ酸、好ましくは300アミノ酸の連続断片を有するポリペプチドをコードし、最も好ましくは配列番号2のタンパク質をコードする。このポリペプチドもまた本発明の主題である。

30

【0032】

即ち、本発明は、以下から選択されるポリペプチドを含むことを特徴とする、単離されたポリペプチドにも関する。

- a) 配列番号2の配列を有するポリペプチド;
- b) 配列番号2の配列のポリペプチドの変異ポリペプチド;
- c) 前記a)のポリペプチドと少なくとも80%の同一性を有する、a)またはb)で定義したポリペプチドに相同的なポリペプチド;
- d) a)、b)またはc)に定義したポリペプチドの少なくとも15の連続するアミノ酸の断片;
- e) a)、b)またはc)に定義したポリペプチドの生物学的に活性な断片。

40

【0033】

好ましくは、455位のアミノ酸はトレオニンである。
本発明の目的にとって、「ポリペプチド」なる用語はタンパク質またはペプチドを意味する。

【0034】

「生物学的に活性な断片」なる表現は、それが由来するペプチド断片と、同じ生物活性、好ましくは同じ桁の範囲内 (10倍の範囲内) の活性を有する断片を意味する。従って、ENS-1タンパク質の生物学的に活性な断片は、ES細胞の多分化能の特性においてある役割を有するかもしれない配列番号2由来のポリペプチドからなる。

50

【0035】

好ましくは、本発明のポリペプチドは配列番号2の配列（*ens-1* 遺伝子によりコードされるタンパク質に相当）または最適の整列化後に配列番号2と少なくとも80%の同一性を有する配列からなるポリペプチドである。

【0036】

このポリペプチドの配列は、最適の整列化後に配列番号2の配列と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは98%の同一性を有する。

「そのアミノ酸配列が、最適の整列化後に参照配列と少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは98%の同一性（%）を有するポリペプチド」なる表現は、参照ポリペプチドと比較してある種の改変、例えば、特に1または2以上の欠失及び/又は短縮、伸長、キメラ的融合及び/又は1または2以上の置換を有するポリペプチドを意味する。

10

【0037】

そのアミノ酸配列が、最適の整列化後に本発明の配列番号2またはその断片と、少なくとも80%、好ましくは90%、より好ましくは98%の同一性を有するポリペプチドの中で好ましいのは、上で規定した変異核酸配列によりコードされる変異ポリペプチド、特に、そのアミノ酸配列が配列番号2またはその断片と比べて少なくとも1つのアミノ酸残基の短縮、欠失、置換及び/又は付加に相当する少なくとも1つの突然変異を有するポリペプチド、より好ましくはそれらを含む細胞の多分化能の消失に関連する突然変異を有する変異ポリペプチドである。

20

【0038】

本発明はまた、本発明のポリペプチドをコードする核酸を含むクローニングベクター及び/又は発現ベクターに関する。かかるベクターは、発現および、場合により宿主細胞中でのポリペプチドの分泌に必要とされる要素も含んでいてよい。かかる宿主細胞もまた本発明の主題である。

【0039】

本発明のプロモーター及び/又は調節配列を含むことを特徴とするベクターもまた本発明の一部である。

このベクターは好ましくは、プロモーター、翻訳開始および終止シグナル、並びに転写の調節に適切な領域も含む。それらは細胞中で安定的に保持されなければならない、場合により翻訳されたタンパク質の分泌を指定する特定のシグナルを含んでもよい。

30

【0040】

これらの各種調節シグナルは、使用される細胞宿主に関連して選択される。この趣旨で、本発明の核酸配列を、選択された宿主中で自律的に複製するベクターに挿入しても、または選択された宿主に組み込まれるベクターに挿入してもよい。

【0041】

自律的に複製する系の中で好ましいのは、宿主細胞に応じて、プラスミドまたはウイルス型の系が使用され、ウイルスベクターとしては特にアデノウイルス（*Perricaudet et al.*, 1992）、レトロウイルス、レンチウイルス、ポックスウイルスまたはヘルペスウイルス（*Epsstein et al.*, 1992）が可能である。

40

【0042】

宿主細胞の染色体への配列の組み込みが望ましい場合、例えば、プラスミドまたはウイルス型の系が使用でき、かかるウイルスは例えばレトロウイルス（*Temin*, 1986）またはAAV（*Carter*, 1993）である。

【0043】

非ウイルスベクターの中で好ましいのは、VICAL社により開発された手法による、裸のDNAまたは裸のRNAなどの裸のポリヌクレオチド、細菌の人工染色体（BAC）、酵母での発現のための酵母の人工染色体（YAC）、マウス細胞での発現のためのマウスの人工染色体（MAC）、好ましくはヒト細胞での発現のためのヒトの人工染

50

染色体 (HAC) である。

【0044】

トリ細胞においては、レトロウイルス、トリアデノウイルス、ポックスウイルスまたは、トランスフェクションもしくは電気穿孔により導入された他のDNAを発現ベクターとして使用できる。

【0045】

かかるベクターは当分野の技術者により通常使用される方法により製造され、それより得られるクローンは、例えばリポフェクション、電気穿孔法、熱ショック、膜の化学的透過性化後の形質転換または細胞融合などの標準的方法を用いて適宜宿主に導入することができる。

【0046】

本発明はまた、本発明のベクターで形質転換された宿主細胞、特に真核細胞および原核細胞、並びにこの本発明の形質転換された細胞の1種を含む、ヒト以外のトランスジェニック動物、好ましくは鳥類または哺乳動物をも含む。特に本発明は、遺伝的マーカーが挿入されたens-1遺伝子を含む動物を含有する。

【0047】

本発明の目的のために使用できる細胞には、細菌細胞 (Olin and Lee, 1993)、酵母細胞 (Buckholz, 1993) および動物細胞、特に哺乳動物細胞 (Edwards and Aruffo, 1993)、殊にチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞が挙げられる。また、例えばバキュロウイルス (Luckow, 1993) を用いる方法を使用できる昆虫細胞も挙げられる。本発明のタンパク質の発現のための好ましい細胞宿主はCOS細胞からなる。

【0048】

使用できるトリ細胞には、LMHニワトリ血腫細胞、QT6 不死化ウズラ細胞および初代または不死化させたニワトリ、ウズラまたはアヒル繊維芽細胞が挙げられる。

【0049】

本発明は、外来遺伝子の導入により改変されたトリES細胞であり、この外来遺伝子はこの細胞が多分化能状態に維持されているときのみ特異的に発現されることを特徴とする、本発明の核酸を含む宿主細胞にも関する。好ましくは、この外来遺伝子はlacZ、GFP、ルシフェラーゼ、ROSA-geoおよび抗生物質耐性に関する遺伝子、特にネオマイシン、ハイグロマイシン、フレオマイシンまたはピューロマイシン耐性遺伝子から選択されるレポーター遺伝子である。

【0050】

これらの本発明細胞は、多分化能をもつ細胞の分化を誘導することを可能にする化合物、またはその多分化能を同時に維持しながら細胞を培養するための培地をスクリーニングするのに非常に有用である。

【0051】

本発明の別の有用な宿主細胞は、本発明の核酸を含み、外来核酸の導入により改変されたトリ細胞からなり、この外来核酸は本発明の核酸中に組み込まれている。本発明の好ましい態様によれば、この外来核酸は、場合によりその前に空間的 - 時間的プロモーター及び/又はターミネーター配列を有する、治療に有用な遺伝子である。別の態様では、この外来核酸はlacZ、GFP、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼおよび抗生物質 (この中には、ネオマイシン、ハイグロマイシン、フレオマイシンまたはピューロマイシンがある) に対する耐性に関する遺伝子から選択されてよい遺伝的マーカーである。

【0052】

好ましくは、上記トリ宿主細胞は、このトリがキジ目 (Galiformes) に属し、特にニワトリまたはウズラであることを特徴とする。

この場合、上記レポーター遺伝子はens-1遺伝子のプロモーターの制御下に組み込まれている、及び/又は上記外来核酸 (治療に有用な遺伝子及び/又は遺伝的マーカー

10

20

30

40

50

) が *ens*-1 遺伝子に組み込まれている。

【0053】

このように、配列番号1のヌクレオチド3111-3670に対応する、本願で同定されたプロモーターを使用することができる。また、ヌクレオチドの数の減少、または追加のヌクレオチドの導入、あるいはあるヌクレオチド上に予め突然変異を形成させておくことによって、このプロモーターを改変することができる。この改変を行うための、また、こうして得られるプロモーターを多能性幹細胞における発現について試験するためのプロトコルは当分野の技術者には既知である。従って、特に、こうして改変された断片のプロモーター活性を失わせることなく、配列番号1の3654位にグアニンを挿入することが可能であることが示された。

10

【0054】

このように、本発明は、配列番号1のヌクレオチド3111-3670に相当する核酸の、トリ多能性細胞中の有用遺伝子の特異的発現のためのこの有用遺伝子のプロモーターとしての使用にも関する。有用遺伝子は、マーカー遺伝子（ルシフェラーゼ、GFP、ガラクトシダーゼなど）であるか、または増殖因子、サイトカイン、免疫認識に関するタンパク質、治療的に有用なタンパク質などのタンパク質をコードする遺伝子でありうる。配列番号1のヌクレオチド3645-3651において「TATAボックス」もまた同定されたことを述べるのは興味深く、これも本発明の主題である。

【0055】

本発明の好ましい細胞は、2000年5月11日に、Collection Nationale de Culture des Microorganismes (National Collection of Cultures and Microorganisms) に識別番号I-2477として寄託された、9N2.5細胞である。

20

【0056】

本発明の細胞は好ましくは多能性ES細胞であるが、本発明はまた、本発明のES細胞由来の分化したトリ細胞にも関することを理解すべきである。これらの細胞は特に、特許出願WO96/12793の教示により、レチノイン酸を用いて分化させることができる。

【0057】

本発明はまた、本発明の細胞を含むトランスジェニック動物にも関する。本発明の動物の中では、トリ、特にキジ目に属するものが好ましい。これらのトランスジェニックトリは *ens*-1 遺伝子またはそのプロモーターにおける改変を検討するのに特に有利である。

30

【0058】

本発明のポリペプチドを発現させるために、トリおよびその他の動物、例えば齧歯類（特にマウス、ラットまたはウサギ）に本発明の核酸を導入することもできる。

【0059】

これらのトランスジェニック動物は、例えば、胚性幹細胞での相対的組換え、これらの幹細胞の胚への移行、生殖系列で作製されたキメラの選択およびこのキメラの成育により得られる。それらはまた、裸のDNAを受精卵母細胞に微量注入することによって得てもよい。

40

【0060】

本発明のトランスジェニック動物は、本発明のタンパク質をコードする遺伝子、またはその相同遺伝子を過発現しても、また変異が導入された該遺伝子が発現しても、またその他に、タンパク質を産生するためのコード配列と関連した *ens*-1 遺伝子の一部を含む導入遺伝子が発現してもよい。

【0061】

あるいは、本発明のトランスジェニックトリは、配列番号2の配列のポリペプチドをコードする遺伝子またはその相同遺伝子を、LOXP/CREリコンビナーゼ系（Rohlmann et al., 1996）またはこの遺伝子の発現を不活性化するための任意のその他の系を用いる不活性化により、欠失させたものとすることができる。

50

【0062】

本発明はまた、組換えポリペプチドを合成するための、本発明の核酸配列の使用にも関する。

それ自体本発明に含まれる、組換え体の形態の本発明のポリペプチドを製造する方法は、形質転換細胞、特に本発明の細胞または哺乳動物を、本発明の核酸配列によってコードされる組換えポリペプチドの発現を可能にする条件下で培養し、この組換えポリペプチドを回収することを特徴とする。

【0063】

この製造方法を用いて得ることができる組換えポリペプチドもまた本発明の一部である。上記のようにして得られた組換えポリペプチドは、グリコシル化形態でも非グリコシル化形態でもよく、そして天然の3次構造を有しても有していなくてもよい。

10

【0064】

組換えポリペプチドの配列はまた、その溶解性、特に水性溶媒中での溶解性を改善するために改変されていてもよい。

例えば、疎水性ドメインの欠如や疎水性アミノ酸の親水性アミノ酸での置換などの、かかる改変は当分野の技術者には既知である。

【0065】

これらのポリペプチドは、当分野の技術者に既知の組換えポリペプチドの製造のための技術により、上記核酸配列を用いて製造できる。この場合、使用する核酸配列は、細胞性宿主におけるその発現を可能にするシグナルの制御下に置かれる。

20

【0066】

組換えポリペプチドの製造のための有効な系は、本発明のベクターおよび宿主細胞を有することが必要である。

これらの細胞は、上記ベクターに挿入されたヌクレオチド配列を宿主細胞に導入し、次いでこの細胞を、トランスフェクトされたヌクレオチド配列の複製及び/又は発現を可能にする条件下で培養することにより得ることができる。

【0067】

組換えポリペプチドを精製するのに使用される方法は、当分野の技術者に既知である。組換えポリペプチドは、細胞溶解液またはその抽出物から、あるいは培地上清から、分画、クロマトグラフィー法、特異的モノクローナルもしくはポリクローナル抗体を用いた免疫アフィニティー法などを単独であるいは組み合わせて使用する方法により精製することができる。

30

【0068】

本発明のポリペプチドはまた、多数の既知のペプチド合成方法の1つを用いた化学合成、例えば固相を用いる方法（特に、Stewart et al., 1984参照）または部分的固相を用いる方法、断片縮合、または溶液中の通常の合成により得ることもできる。

【0069】

化学合成により得られ、対応する異常アミノ酸を含んでいてよいポリペプチドもまた本発明に含まれる。

40

本発明のポリペプチドを特異的に認識しうることを特徴とする、モノクローナルもしくはポリクローナル抗体、もしくはその断片、キメラ抗体または免疫複合体 (immunoc conjugate) は本発明の一部である。

【0070】

特異的ポリクローナル抗体は、本発明のポリペプチド、特に遺伝的組換えまたは通常の方法によるペプチド合成により製造されたポリペプチドで免疫された動物の血清から得ることができる。

【0071】

本発明のある種のポリペプチド、変異体またはその免疫原性断片を特異的に認識する抗体の利点が特に言及される。

50

配列番号2の配列のポリペプチドを特異的に認識しうることを特徴とする、モノクローナルもしくはポリクローナル抗体、もしくはその断片、キメラ抗体または免疫複合体が特に好ましい。

【0072】

特異的モノクローナル抗体は、KohlerおよびMilstein(1975)により既報のハイブリドーマ培養の慣用の方法により得ることができる。

本発明の抗体は、例えばキメラ抗体、ヒト化抗体またはFabもしくはF(ab')₂断片である。それらはまた、検出可能な及び/又は定量可能なシグナルを得るために、免疫複合体または標識化抗体の形態であってもよい。

【0073】

本発明はまた、本発明の抗体を用いることを特徴とする、本発明のポリペプチドを検出及び/又は精製する方法に関する。

本発明は、本発明方法を用いて得られることを特徴とする精製ポリペプチドも含む。

【0074】

さらに、本発明の抗体、特にモノクローナル抗体は、ポリペプチドの精製のための使用に加え、生物学的試料中のこれらのポリペプチドの検出にも使用できる。

【0075】

従って、それらは、本発明ポリペプチド、特に配列番号2の配列のポリペプチドまたはその変異体の特定組織部分上での発現の、例えば、免疫蛍光法、金標識及び/又は酵素的免疫複合体を用いる免疫細胞化学的または免疫組織化学的解析のための手段を構成する。

【0076】

それらは特に、生物学的試料または組織中のこれらのポリペプチドの発現を証明することを可能にする。

さらに一般的には、本発明の抗体は、正常なまたは突然変異した本発明ポリペプチドの発現を観察しなければならない任意の状況において有利に使用できる。

【0077】

従って、生物学的試料を本発明の抗体に接触させる工程、および形成される抗原-抗体複合体を証明する工程を含む、生物学的試料中の本発明のポリペプチド検出方法も本発明の主題であり、またかかる方法を実施するためのキットもそうである。かかるキットは特に以下を含む。

- a) 本発明のモノクローナルもしくはポリクローナル抗体、
- b) 場合により、免疫反応に適した媒体を構成するための試薬、
- c) 免疫反応の間に生成する抗原-抗体複合体を検出する試薬。

【0078】

これらの抗体はヒト血清から直接得ても、本発明のポリペプチドで免疫した動物から得て、次いで「ヒト化」してもよい。

本発明の抗体は、配列番号2のポリペプチドの存在を決定するのに非常に有用であり、従って、トリES細胞の多分化能を決定することを可能にする。

【0079】

配列番号1に対応する遺伝子または配列番号1のmRNAの発現産物を決定することを特徴とする、トリES細胞の多分化能の決定方法もまた、本発明の主題である。

【0080】

即ち、本発明は、トリES細胞、特にキジ類のES細胞において、これらの細胞が多能性である場合に特異的に発現されるens-1遺伝子の配列を開示する。従って、この遺伝子に適用される、遺伝子の発現を検出する方法により、検討した細胞の性質を迅速に決定することが可能となる。

【0081】

特に、上記のように、この遺伝子の発現産物は、例えば本発明の抗体を用いて、ウェスタンブロットティングまたは既報のその他の方法により検出することができる。

【0082】

10

20

30

40

50

本発明のプローブまたはプライマーを用いてノーザンブロットイングまたはRT-PCRにより配列番号1のmRNAを検出することも可能である。

この遺伝子の発現の検出はまた、それぞれ本発明の核酸またはポリペプチドを含むDNAチップまたはタンパク質チップを用いて行うこともできる。かかるチップも本発明の主題である。

【0083】

本発明のタンパク質チップはまた、本発明のポリペプチドと、その他のタンパク質または化合物との間の相互作用を検討することを可能にし、従って、本発明のポリペプチドと相互作用する化合物をスクリーニングするのに有用である。

【0084】

本出願人はまた、ens-1遺伝子がキジ科(galliform family)のトリのみに見出されることを示した。従って、本発明は、本発明の核酸の存在、特に配列番号1の存在をトリの遺伝子中に検出することを特徴とする、トリをキジ目(order Galliformes)に属するとして分類するための方法にも関する。

【0085】

ens-1遺伝子がキジ類のトリのみに見出されるというこの特性により、本発明の核酸の存在、特に配列番号1の存在を試料中に検出することを特徴とする、食品試料中にキジ目のトリ由来の試料の存在を決定する方法を明かにすることができる。

【0086】

生物学的試料もしくは食品試料中、またはトリのゲノム中の本発明核酸の存在は、各種方法により検出できる。特に、以下の工程を含むことを特徴とする、生物学的試料もしくは食品試料中に本発明の核酸を検出及び/又は解析する方法を明かにすることが可能である。

- a) 該試料を、標識された、請求項1~3のいずれかの項記載のポリヌクレオチドに接触させる、
- b) このポリヌクレオチドとこの試料の核酸との間に形成されたハイブリッドを検出及び/又は解析する。

【0087】

本発明の核酸から選択されるプライマーを用いた試料の核酸の増幅工程を行うことによつて、生物学的試料もしくは食品試料中に本発明の核酸を検出及び/又は解析することも可能である。

【0088】

実施例において実証されるように、本発明の核酸はトリES細胞において、この細胞が多分化能を有する場合にのみ発現する。さらに、細胞が多分化能を有する場合に特異的に発現するレポーター遺伝子を持つ、本発明によって改変されたES細胞、特に9n2.5細胞は、有用化合物のスクリーニングに使用できる。

【0089】

特に、それらは、以下の工程を含むことを特徴とする、多能性細胞の分化を誘導しうる物質または媒体をスクリーニングする方法において使用できる。

- a) 本発明のES細胞を、多分化能表現型を維持させうる培地中に維持し、
- b) 物質をこの培地に添加するか、またはこの培地を試験すべき培地で置換し、
- c) 配列番号2のタンパク質または外来遺伝子の発現の欠如により、分化の誘導を決定する。

【0090】

この方法は、好ましくは、ens-1遺伝子のプロモーターの制御下にレポーター遺伝子を挿入することにより改変したES細胞を用いて行い、このレポーター遺伝子の発現の欠如を検出する。好ましくは9N2.5細胞が使用され、ガラクトシダーゼの発現の欠如を検出する。

【0091】

本発明の細胞を用い、以下の工程を含む方法を用いて、分化した細胞の多分化能を復帰さ

10

20

30

40

50

せうる物質をスクリーニングすることも可能である。

- a) 分化した細胞を適宜培地中に維持し、
- b) この培地を、多分化能表現型を維持させることができ、試験すべき物質を含む培地で置換し、
- c) この細胞中での、配列番号2のタンパク質または外来遺伝子の発現により、この細胞の多分化能の復帰を決定する。

【0092】

この方法は、ens-1 遺伝子に、またはそのプロモーターの制御下にレポーター遺伝子を挿入することにより改変した本発明の分化細胞を用いても有利に行える。 - ガラクトシダーゼ発現の検出を可能にする分化した9N2.5細胞が有利に使用される。

10

【0093】

上記方法もまた本発明の主題であり、この方法を用いて得られる培地または物質もそうである。

本発明のかかる物質は、(小さな有機分子型の) 化学的構造を有する化合物、脂質、糖、タンパク質、ペプチド、タンパク質-脂質、タンパク質-糖、ペプチド-脂質またはペプチド-糖の混成化合物、または化学的分枝が付加されたタンパク質もしくはペプチドであってよい。

【0094】

予想される化合物には、芳香族であっても芳香族でなくてもよい、1または2以上の環、および任意の種類の一つの残基(特に、低級、すなわち炭素数1~6のアルキル基)

20

【0095】

ES細胞の多分化能の特性に関与する遺伝子を決定すること、またはこの特性に対するマーカーをもつことを利用するのは極めて重要である。即ち、これらの細胞は全組織の形態形成に寄与する能力をもつため、これらの細胞の遺伝的改変により、求める特性が作製された動物の全組織中に見出されることを確実にしうる。さらに、空間的-時間的特異性を有する各種プロモーターの制御下、ens-1 遺伝子の座位に外来遺伝子を導入することにより、一定の組織または一定の発達段階においてこの遺伝子を発現するトランスジェニック動物を得ることができるかもしれない。実際、ens-1 遺伝子の特異性は、宿主細胞が多分化能を有する場合のみ発現するというものであるため、この座位への外来核酸の導入が胚の発達を害するべきではない。

30

【0096】

従って、例えば、治療に有用なタンパク質(ホルモン、増殖因子、リンホカイン)をコードする治療に有用な遺伝子を導入して、胚の発生の間にこれらのタンパク質を製造できるようにすることが可能である。実際、その殻が無菌環境を確実にする卵において治療用タンパク質を製造することは非常に有利であるかもしれない。

【0097】

また、本発明の多能性細胞を使用して、それらが動物、特に鳥類、より好ましくはキジ目の鳥類の生殖組織に定着し、特定の遺伝的性質がそれらの子孫に伝達されるようにすることができる。これは、ニワトリ、シチメンチョウ、ウズラなどの産業的品種を経済的観点から特に有利な方法で改良することを可能にする。

40

【0098】

また、以下から選択される化合物を、場合により、トリ細胞の多分化能の復帰を可能にするか、または、他方では、ES細胞の分化を誘導するために、医薬として使用することも可能である。

- a) 本発明の核酸、
- b) 本発明のポリペプチド、
- c) 本発明のベクター、
- d) 本発明の細胞、
- e) 本発明の抗体、

50

f) 本発明の物質。

【0099】

従って、本発明はES細胞のマーカーの配列を提供することにより、ES細胞の多分化能のよりよい特性決定への道を開くものである。しかし、この遺伝子がこの性質に必須の因子であるかどうかは決定されていない。よって、ens-1 遺伝子を分化した細胞に、例えば適宜プロモーター制御下のプラスミド上に導入して、細胞の多分化能の復帰の可能性を検討することにより、この問題に対する答えを出せるであろう。適当なプロモーターの中で、誘導性プロモーター、例えば糖により誘導しうるプロモーターを選択し、プラスミド上の遺伝子の発現の誘導が停止した場合に、この細胞の多分化能が決定されるであろう。また、一定時間後にens-1 遺伝子の切り出しを生じるプラスミド（例えば、それを2つのloxP配列間に置き、Creリコンビナーゼをコードする第2のプラスミドを導入することにより）を作製することも可能である。細胞の多分化能を決定するためには、本発明の9N2.5細胞を用い、ens-1 遺伝子をコードするプラスミドの導入後、 β -ガラクトシダーゼの発現を検索することが有利であるかもしれない。

10

【0100】

ens-1 遺伝子が細胞の多分化能のインデューサーであることを決定できるなら、ens-1 遺伝子を分化細胞で発現させることを特徴とする、この性質を復帰させる方法（これも本発明の主題である）を実施できるかもしれない。上記方法は、当分野の技術者に既知のある種の改良を導入して用いることができる。

【0101】

以下の実施例は本発明を例示することを可能にするものであり、本発明を限定すると考えるべきではない。

20

【0102】

【実施例】

実施例1：多分化能に対する遺伝的マーカーを含むニワトリES細胞の作製

多分化能をもつES細胞中で特異的に発現される遺伝子を同定するため、「遺伝子トラップ」方式に従った。この方式は、ES細胞のゲノムに、外来性コード配列を含むが、それ自身のプロモーターが欠失したマーカー遺伝子を導入することからなる。前記細胞のゲノムへのこのマーカーのランダム挿入は、場合によっては、この外来性遺伝子を細胞性ゲノムに属するプロモーターの下流に位置させることになる。この形態では、外来性遺伝子がとる発現の調節は、これがその中に挿入された遺伝子のそれと、同一とまでいかなくても、非常に似ている。このように修飾された細胞内のマーカー遺伝子の発現後、このように「標識」された細胞性遺伝子の発現のパターンに関する情報が次に得られる。

30

【0103】

遺伝子トラップ系として、本発明者らは、Friedrich and Soriano (1991)により記載されたROSA- β -geoベクターの性質を活用するものを用いた。この系は、5' - 3'の順で互いに融合した、それぞれLacZおよびNeo^Rの2つの遺伝子を保有するプラスミドからなる。融合遺伝子は、単一のLacZ-Neoタンパク質をコードし、それを産生する細胞にG418に対する耐性と β -ガラクトシダーゼ活性の両方を付与する。このプラスミドの構造を図1に示す。このプラスミドを、その線状化を生じさせるDraI酵素で開裂した。線状化したプラスミドを電気穿孔法によりニワトリES細胞に導入した。このために、Pain et al, (1996)に記載された条件下に保持されたニワトリES細胞の培養物を使用した。ES細胞はプロナーゼによる制御された処理により培養皿から回収した。懸濁状態の細胞を洗浄し、0.8 ml中5 × 10⁶の濃度でGlasgow培地に懸濁させた。この細胞懸濁液に10 μgの線状化プラスミドを加え、懸濁液を4に10分間保持した。懸濁液を次いで、下記条件下での2回の電気刺激からなる電気穿孔処理に付した：BioRad電気穿孔装置内で1mm厚のキュベット中、280 V、500 mF。細胞をその後4で10分間保持してから、参考文献として援用するPain et al. (1996)に記載の方法に従って、培養液中に接種した。36時間後、培養液にG418を250 μg /

40

50

mlの濃度で添加した。G418を含有する培地を4日間にわたって毎日、その後は一日おきに交換した。G418耐性ES細胞クローンは6日目から明らかになった。それを培養開始から8~10日の間に別々にサンプリングした。これらのクローンを、増幅するため、G418を含有する新鮮培地に別々に接種した。その後、それらを液体窒素中で貯蔵した。

【0104】

電気穿孔した細胞において、ROSA^{-/-}geoマーカーの発現を、下記方法に従ってβ-ガラクトシダーゼ活性をその場で同定することにより分析した。懸濁状態の細胞を、1%のホルムアルデヒド、0.2%のグルタルアルデヒドおよび0.02%のNonidet P-40を含有するPBSを主成分とする混合物中に、4℃で30分間固定した。次に、1mg/mlの5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトプラーノシド、5mMのK₃Fe(CN)₆、5mMのK₄Fe(CN)₆、2mMのMgCl₂及び0.02%のNonidet P-40を含有するPBS中で、1~24時間の範囲内となるりうる時間にわたって、37℃でインキュベーションした。β-ガラクトシダーゼマーカーを発現した細胞は青色に着色されていた。

10

【0105】

目的は、多分化能を有する場合にのみES細胞内で機能しうるプロモーターの下流にROSA^{-/-}geoベクターが挿入されたES細胞を同定することであった。いくつかのクローンを特性決定した後、9N2.5と呼ばれる1つのクローンが選択された。このクローンは、Painetal.(1996)に記載されたような、細胞の多分化能性の持続を確保する培養条件下に細胞を保持した場合にのみ、β-ガラクトシダーゼ検定に対して陽性(正)の反応を与えた。この試験の陽性は、9N2.5細胞を分化しよう誘導した場合には失われた(下記参照)。

20

【0106】

9N2.5クローンをin vitro培養で増幅した後、液体窒素中で凍結することにより生存可能な形態で貯蔵した。

実施例2: 9N2.5細胞の特性決定

9N2.5細胞をニワトリES細胞についてPainetal.(1996)により記載された培養条件下に保持した。これらの条件下で、9N2.5細胞は、Painetal.(1996)により記載されたニワトリES細胞特有の形態、テロメラーゼ活性および抗原エピトープを示すことが検証された。この細胞はまた、親細胞と同様に、胚様体(embryoid bodies)を形成することができる。従って、電気穿孔、G418における選択、およびその後の細胞の増幅は、それらのES細胞の特性を阻害していなかった。

30

【0107】

分化細胞におけるROSA^{-/-}geoマーカーの発現を分析するため、9N2.5細胞をPainetal.に記載の方法に従って、分化するように誘導した。これらの細胞を、支持細胞の不存在下、LIFおよびサイトカインの不存在下、ならびに5×10⁻⁶M濃度のレチノイン酸もしくは1%濃度のDMSOのいずれかの存在下で培養した。一部の培養では、レチノイン酸とDMSOを同時に添加した。ES細胞分化誘導培地中では、Painetal.(1996)により初めて記載されたものと同じの分化細胞の出現を同じ条件下で観察することができた。

40

【0108】

分化用培地中での培養4日後に、細胞はβ-ガラクトシダーゼ活性の検定に対して完全に陰性になった。ROSA^{-/-}geo導入遺伝子の発現の欠失を確認するため、その発現を、主にRT-PCR法によりLacZ mRNAを探ることにより追跡した。このため、配列番号3および配列番号4のプライマーを使用した。

【0109】

図2に示したように、ROSA^{-/-}geo導入遺伝子によるRNA産生量は、多分化能を維持する培地(ES培地)中で細胞を5日間培養する間には変化しない。他方、レ

50

チノイン酸単独、もしくはDMSO、もしくはレチノイン酸とDMSOのいずれかを含有する分化培地中では、ROSA^{-/-}geo mRNAの量は培養4日後に著しく減少した。確認のため、LacZ配列に特異的な標識プローブを用いたノーザンブロット法によってもROSA^{-/-}geo mRNAを分析した。図3に示したように、レチノイン酸の存在下では、LacZ mRNAは培養2日後には実質的に検出できなくなったのに対し、レチノイン酸を含有しない培地中ではLacZ mRNAの発現が維持された。

【0110】

結論

選択した9N2.5細胞は、多分化能のある状態に保持されると、ROSA^{-/-}geo導入遺伝子を発現した。この導入遺伝子の発現は、培養中のこれらの細胞の分化を誘導した後、非常にすばやく停止する。

10

【0111】

実施例3：9N2.5細胞中のROSA^{-/-}geo導入遺伝子の*in vivo*発現の検定

胚中*in vivo*での9N2.5細胞の発生能とROSA^{-/-}geo導入遺伝子の発現を解析するため、Painet al. (1996)により記載されたプロトコルに準じて、Eyal-Giladi and Kochavスケール(1976)(E-G & Kスケール)に従ってX期のニワトリ胚に9N2.5細胞を移植した。注入細胞の子孫の存在を、 β -ガラクトシダーゼ検定を用いて、移植後の各種の発生段階で調査した。図4に示すように、 β -ガラクトシダーゼに対して陽性の細胞の凝集体が、注入された胚において、XIII期に到達した胚の原外胚葉(epiblast)中に検出された。これらの陽性細胞は透明帯の原外胚葉中でのみ同定された。発生のより後期の原腸形成期、Hamburger and Hamilton(H&H)スケールに従うと5期では、陽性細胞は原始線条および胚体外生殖半月体(extra-embryonic germinal crescent)だけに見られた。原始線条では、ほとんどがヘンゼン結節に位置する数個の凝集体中に上記細胞が同定された。13期(H&Hスケール)では、胚の尾部にまだ開いている神経板に対応する菱形洞のみに陽性細胞が見られた。胚発生の後期には、神経起源の一部の組織とさらに生殖腺原基に非常にわずかな孤立細胞の形態で見られるだけであった。

20

【0112】

β -ガラクトシダーゼ反応の陰性の性質にもかかわらず、9N2.5細胞の子孫が実際には後期胚の組織に群をなして定着していたかどうかを検証するために、ROSA^{-/-}geo導入遺伝子の存在を、2日目および4日目の全胚体から抽出されたDNAにおいてPCRにより調査した。図5に示すように、ROSA^{-/-}geo導入遺伝子に特有のバンドを検出することができた。これは、移植された9N2.5細胞の子孫である細胞が移植から少なくとも4日後には存在したことを示している。

30

【0113】

9N2.5細胞が注入された一部の胚は、発生を終えて、ヒヨコになった。各種の組織から単離されたDNAについて、ROSA^{-/-}geo導入遺伝子の配列の調査をPCR法を用いて行った。その結果、分析した2羽のヒヨコにおいて、導入遺伝子の存在が皮膚、砂嚢および肝臓で明らかとなった。これらの組織の全てが β -ガラクトシダーゼ活性を示すことはなかった。これは、導入遺伝子が移植した9N2.5細胞に由来する分化細胞中に存在することを示している。

40

【0114】

結論

従って、9N2.5細胞は宿主胚に定着して、その中で発生することができる。しかし、ROSA^{-/-}geo導入遺伝子の発現は、胚への移植の非常に初期の細胞と、さらに生殖腺および神経系のような数少ない組織中に存在するわずかな細胞に限られたままである。培養中の9N2.5細胞について行った観察結果を考慮すると、上記細胞内でのROSA^{-/-}geo導入遺伝子の*in vivo*発現は、分化を開始していない細胞に

50

限られると推察することが妥当である。

【0115】

9N2.5 細胞から *in vitro* および *in vivo* で得られたこれらのデータはすべて、その転写活性が多分化能状態の ES 細胞に特異的である、細胞ゲノムのある遺伝子座に ROSA - - *geo* 導入遺伝子が挿入されているという推測に導く。

【0116】

実施例 4：9N2.5 細胞の *in vivo* 増殖

9N2.5 細胞が胚のある種の区画の中で増殖することができるかどうかを解析するため、2つの注入された胚を7日間のインキュベーション後にサンプリングした。胚を、頭部、上肢原基を含む胸部、および下肢原基を含む尾部の3つの部分に任意に切り分けた。これらの部分をプロナーゼ中で解離させ、得られた細胞懸濁液を、Pain et al. (1996) により記載された培養法に従って培養物中に接種した。250 μ g/ml の G418 による選択を6日間実施した。全ての培養物に耐性細胞のいくつかの部位が現れたが、これらの部位の頻度は、胚の後部が接種された培養物がずっと高かった。この培養物から得られた G418 耐性細胞を、最初の接種から7日後に、増幅のため継代培養した。これらの並行培養物の一部を、 β -ガラクトシダーゼ活性の発現について実際に試験した。この手法により、試験した2つの胚の一方について、 β -ガラクトシダーゼに対して陽性で、G418 に対して耐性があり、注入された9N2.5 細胞と同一の形態を示す細胞を維持し、増幅して、さらには生存可能な形態で凍結することが可能になった。第2の胚から得られた細胞は、 β -ガラクトシダーゼ活性に関して陽性であるが、ゆっくりしか増殖せず、十分に増殖させることができなかった。

【0117】

結論

従って、これらの結果は、9N2.5 細胞が胚のある種の領域内で ES 細胞の形態でそれら自体を維持することができることを示す。これらの細胞は、恐らく、9N2.5 細胞が注入された胚の部分上で同定された希少な β -ガラクトシダーゼ陽性細胞（上記参照）に対応する。胚の後部部分におけるそれらの位置に関しては、*in vivo* で9N2.5 細胞の特性を保存する細胞の一部は、マウスおよびヒトにおいて報告された EG 細胞 (Matsui et al. 1992, Shamblo et al. 1998) に対応すると示唆することもできよう。EG 細胞は、ES 細胞に非常に近い多分化能と細胞特性を有する生殖細胞の前駆細胞である。

【0118】

実施例 5：物質をスクリーニングするための9N2.5 細胞の使用

9N2.5 細胞は、未分化状態にある時には β -ガラクトシダーゼを強力に発現する。分化が誘導されると、この発現は失われる。この性質を、各種の分化誘導もしくは分化促進分子の試験、または非誘導分子の試験に利用することができる。例えば、9N2.5 細胞を、ES 細胞を培養するのに適した血清のバッチを同定するため、またはその区別のための試験担体として使用することができる。このためには、この細胞を、親細胞を維持するのに使用するのと同じ培地に接種する。この培地中で、参照血清を、場合により各種濃度の、試験する各種の血清で置換する。接種は非常に低密度（35 mm の皿あたり 2×10^4 個の細胞）で行い、細胞を次いで固定し、染色して、 β -ガラクトシダーゼ活性を顕示させ、陽性部位の数を推計する。陽性部位の数は、ES 細胞の自己更新を維持する血清の能力と直接関係する。この例は、天然物でも合成物でもよい各種物質の試験に拡張することができる。

【0119】

結論

9N2.5 細胞を使用して、物質が持つ培養物中の ES 細胞の自己更新または分化を誘導する能力に基づいて物質をスクリーニングすることができる。

【0120】

実施例 6：9N2.5 ES 細胞中の ROSA - - *geo* 導入遺伝子の組込みの位置の

同定

9 N 2 . 5 細胞中の R O S A - - g e o 導入遺伝子の組込みの位置を同定するための第 1 の手法では、9 N 2 . 5 細胞のゲノム DNA をサザンブロッティング法により解析した。9 N 2 . 5 細胞 DNA を、ある特異な部位でのみ R O S A - - g e o 導入遺伝子をそれぞれ開裂する E c o R I 制限酵素または D r a I 酵素で切断処理した。切断処理された DNA を電気泳動的に移行させた後、フィルターを L a c Z 断片に対して特異的なプローブとハイブリダイズさせた。図 6 に示すように、実施された切断のそれぞれにおいてこれらの条件下では単一のバンドが同定された。R O S A - - g e o 導入遺伝子を含まない正常なニワトリ E S 細胞の DNA ではバンドは同定されなかった。これらの結果は、9 N 2 . 5 細胞においては、R O S A - - g e o 導入遺伝子のただ 1 つのコピーが組み込まれていることを実証した。

10

【 0 1 2 1 】

第 2 に、この導入遺伝子から転写された m R N A のサイズを分析した。9 N 2 . 5 細胞からの RNA を、L a c Z プローブを用いたノーザンブロッティングにより解析した。図 7 に示すように、大きさ 4 . 7 k b の単一の転写物が現れた。この転写物は正常 E S 細胞の RNA 中には存在しない。R O S A - - g e o 導入遺伝子から転写されるはずの配列の予想される長さ、すなわち 3 . 9 k b を仮定すると、9 N 2 . 5 細胞に現れる転写物は、導入遺伝子が挿入された細胞性遺伝子由来の約 0 . 8 k b の配列を含むと推定されなければならない。これらの細胞性配列は m R N A 上に 5 ' 位または 3 ' 位のいずれかの位置で存在するか、または R O S A - - g e o 導入遺伝子から転写された配列の両側に分布するかもしれない。5 ' 領域でそれらを検索するために、C l o n t e c h 社のマラソン (M a r a t h o n) キットを用いる 5 ' R A C E 手法を用いた。

20

【 0 1 2 2 】

L a c Z 領域に特異的なプライマー、配列 (配列番号 5) のプライマーを用いて、9 N 2 . 5 細胞の RNA から相補的 DNA 鎖を合成した。

この第 1 の鎖に相補的な第 2 の鎖の合成後、二本鎖の相補的 DNA を、その配列が配列番号 6 である、マラソンキットにおいて供給されるリンカーに連結した。次いで、この完全融合配列を、配列番号 7 および配列番号 8 のプライマーを用いて P C R 法により増幅した。

【 0 1 2 3 】

増幅は P e r k i n E l m e r 2 4 0 0 装置において次の条件下で行った：9 4 で 3 0 秒間、次に、それぞれ 9 4 で 5 秒間を 5 サイクル、次に、7 2 で 4 分間、次に、それぞれ 9 4 で 5 秒間を 5 サイクル、次に、7 0 で 4 分間、次に、それぞれ 9 4 で 5 秒間を 2 5 サイクル、次に、6 8 で 4 分間。4 0 0 塩基対の増幅産物を同定した。F 1 と称されるこの断片を、増幅するためにプラスミドにクローン化し、次いでその正確な配列を決定した。次いで、我々は、R T - P C R 法を用いて E S 細胞において転写された m R N A 上の F 1 配列の下流に位置する配列を検討した。このためには、正常 E S 細胞 RNA をマトリックスとして使い、配列番号 9 の配列を有するプライマー P 3 を用いてプライミングすることにより相補的 DNA を合成した。

30

【 0 1 2 4 】

次いで、1 本鎖の相補的 DNA を、最初 5 ' - R A C E 法により増幅した断片の 5 ' 配列に相当する配列番号 1 0 のプライマー、および配列番号 1 1 のプライマーを用いた P C R 法により増幅した。

40

【 0 1 2 5 】

C 1 と称される断片をこのように増幅し、次いでプラスミド中にクローン化した。C 1 の正確な配列を決定した (配列番号 1 2) 。

C 1 配列が実際に、9 N 2 . 5 細胞中の L a c Z 配列をも有する m R N A であることを確認するために、これらの細胞から誘導される m R N A 上において、断片 C 1 に特異的であるプライマー P 4 (配列番号 1 3) および、L a c Z 配列に特異的であるプライマー L a c Z B をそれぞれ用いて R T - P C R による増幅を行った。

50

【0126】

331塩基対の断片を同定した。この断片のサイズは予想したものに相当し、これはC1配列およびLacZ配列が実際に同じmRNA上にあることを示す。このようにC1配列は、ROSA - - geo導入遺伝子が挿入された細胞性遺伝子に特異的であるに違いないことが確認された。この遺伝子はens-1 (embryonic normal stem cell gene、胚性正常幹細胞遺伝子) と呼ばれた。

【0127】

ens-1 遺伝子が実際にメッセンジャーRNA を産生することを検証するために、正常ニワトリES細胞のRNAを、C1プローブを用いたノーザンブロッティング法により解析した。図8・Aに示されるように、C1プローブは大きさ約4.7 kbの主要RNA、およびそれぞれ約10 kbおよび2 kbの非常に弱く標識された2つのRNAを同定する。

10

【0128】

C1配列に基づき、ens-1 遺伝子から転写された完全mRNAのクローニングを行った。

このために、ニワトリES細胞から単離したポリアデニル化RNAより作製したcDNAライブラリーを、断片C1から調製したプローブを用いてスクリーニングを行った。

【0129】

4.2 kpbの相補的DNAを単離した。このcDNAが実際にens-1 遺伝子から転写されたmRNAを表わすものかどうかを検証するために、C1配列の下流に位置する、2つの異なるcDNA断片に対応する、2つのヌクレオチドプローブ、それぞれS1およびS2を作製した。これらの2つのプローブは、正常ニワトリES細胞から単離された対応RNAをノーザンブロッティング法により同定するのに使用された。図8・Aに示すように、これらの2つのプローブは予めC1プローブで同定された主要RNAと同じ、約4.5 kbの大きさのRNAを同定する。後に示すように、2つのプローブS1とS2で同定されたこのRNAの発現のパターンは、正常ES細胞中にC1プローブで同定された主要RNAのものと同じである。

20

【0130】

これらのデータはすべて、C1、S1およびS2プローブが正常ニワトリES細胞中で同じens-1 mRNAを認識することを非常に強く示唆する。

30

ens-1 mRNAの配列を配列番号1に示し、cDNAの構造を図8・Bに示す。この配列の解析により、おそらく490アミノ酸のタンパク質をコードしている非常に長いリーディングフレームが明らかになり、その配列は配列番号2に示される。C1配列は多型性であり、cDNAクローンから得られ、配列番号1に示すものは、前に5'-RACE法により得られたもの(配列番号12)とはやや異なる。

【0131】

ens-1 遺伝子が実際に、9N2.5細胞においてROSA - - geo導入遺伝子が挿入された遺伝子に相当することを確認するため、ニワトリ胚の発生の間および培養中のニワトリES細胞の分化の間のens-1 遺伝子発現のパターンを、ノーザンブロッティング法により分析した。

40

【0132】

図9に示すように、C1プローブおよびS1プローブは正常なニワトリ48時間齢の胚から抽出したRNA中に同じ4.5 kbのRNAを同定する。シグナルの強さは、3日齢胚および4日齢胚などの、より時間のたった胚から抽出したRNAにおいて大きく減少する。シグナルは7日齢胚または8日齢胚から抽出したRNAにおいて消失する。肝臓、筋肉、砂嚢、脳、心臓、眼、骨または皮膚などの各種ニワトリ組織から抽出したRNAにおいてはゼロである。

【0133】

ニワトリ胚の発生の第1期におけるens-1 遺伝子の発現のパターンをより正確に決定するために、ens-1 mRNAを完全な胚でのin situ ハイブリダイゼーシ

50

ョン法により検索した。結果を図10に示す。非常に強いシグナルがX期およびX I I I期の胚の透明帯において観察された (E - G & K スケール)。2期 (H & H スケール) の胚では、シグナルは原条の領域において優先的に透明帯においてのみ見出された。5期 (H & H スケール) では、シグナルはヘンゼン結節および原条のくちばし尾部 (rostrorocaudal) 領域において、また胚の前方部分に位置する生殖半月体 (germinal crescent) に非常に明瞭な形態で見出された。胚の発生のより進んだ段階では、顕著なシグナルは検出されない。C 1 および S 1 プローブで同じ発現パターンが観察された。

結論

ens - 1 遺伝子は未分化ニワトリES細胞および胚発生の極めて初期の段階に特異的な発現を示す。原腸形成が完了した後は、遺伝子の発現は非常に弱くなるか、検出されなくなる。

10

【0134】

従って、*ens - 1* 遺伝子は、未分化胚性細胞が胚に存在していようが、*in vitro* 培養のこの段階に維持されていようが、未分化胚性細胞に対する非常に特異的なマーカーとなる。*ens - 1* 遺伝子はまた、生殖半月体の細胞に対して、従って配偶子前駆細胞に対して特異的である。

【0135】

実施例7：進化の過程での*ens - 1* 遺伝子の保存

進化の過程での*ens - 1* 遺伝子の保存の程度を分析するために、ニワトリ*ens - 1* 遺伝子に特異的なプローブを用いて、サザンブロッティング法により様々な動物種由来のゲノムDNAをハイブリダイズさせた (示さず)。*ens - 1* 遺伝子に特異的な2つのプライマー (配列番号14および15) 間でのPCR法による次のプロトコルを用いた核酸配列増幅の手法も使用した：96 で3分、(96 30秒、62 30秒、72 30秒、10サイクル)、(96 30秒、57 30秒、72 30秒、10サイクル)、(96 30秒、52 30秒、72 30秒、20サイクル)。図11に示す結果は、相同配列がキジ目 [ニワトリ、ウズラ、シチメンチョウ、赤足イワシヤコ (*red-legged partridge*)、灰色イワシヤコ] においてのみ見出されることを示す。*ens - 1* に対する相同体は哺乳動物においては見られないことは注目すべきである。

20

30

【0136】

実施例8：その活性が胚性幹細胞に特異的である、転写プロモーター配列の*ens - 1* 遺伝子における同定

ens - 1 遺伝子はニワトリ胚性幹細胞において特異的に発現される遺伝子であると同定された。

【0137】

その転写活性が未分化のニワトリES細胞に対して特異的であるプロモーター領域を*ens - 1* 遺伝子において同定した。これは、胚性幹細胞において、そしておそらく原腸形成の前の段階のニワトリ胚において特異的に導入遺伝子の発現を標的化しうるであろう遺伝的手段を提供するので、応用を考慮すべきである。

40

【0138】

ens - 1 転写物の末端の反復配列の存在は、これらの配列がレトロウイルスLTR (long terminal repeat、長い末端反復) 配列に関連することを示唆した。レトロウイルスLTRは3つの部分、それぞれU3、RおよびU5 (5' - 3' 方向で)、に分けられる。レトロウイルスゲノムにおいては、U3領域は転写を活性化でき、時に組織特異的制御を伴う。レトロウイルスのメッセンジャーRNAでは、R - U5配列のコピーが5'位に、U3 - R配列のコピーが3'位にみられる。

【0139】

レトロウイルスLTRの構造との類似によって、おそらくレトロウイルスU3、RおよびU5領域に相当するであろう領域が、*ens - 1* 遺伝子のメッセンジャーRNAにお

50

いて同定された。e n s - 1 転写物の2つの末端で反復しているとして同定された配列は、R領域に相当し、U3領域に相当するであろう配列はe n s - 1 に対するコード配列の3'末端と、Rの5'末端の間に位置する(図12)。

【0140】

e n s - 1 遺伝子のRおよびU3-R領域のプロモーター活性を試験するために、これらの領域を、ホタルルシフェラーゼ受容体遺伝子上流にセンスおよびアンチセンスの2つの可能な方向でクローン化し、それぞれセンス(S)およびアンチセンス(AS)のプロモーター1およびプロモーター2と称されるベクターを得た(図12)。これらの作製物を、トランスフェクション効率の内部対照としてサイトメガロウイルスのプロモーターの制御下にウミシイタケ*Renilla*のルシフェラーゼ遺伝子を含むベクターp

10

20

30

40

50

【0141】

プロモーター1およびプロモーター2の各種ベクターの、9N2.5細胞へのトランスフェクションおよび内部対照を用いたルシフェラーゼ活性の測定により、ニワトリ胚性幹細胞(9N2.5細胞)中のプロモーター2SベクターのU3領域については転写活性を同定できたが、一方、R領域は有意な活性を示さない(図13)。他方、このプロモーターの活性は、試験したその他の各種細胞系(Qt6ウズラ繊維芽細胞、QBrウズラ上皮細胞またはヒト上皮細胞)では非常に低い。さらに、プロモーター2Sベクターを、レチノイン酸での処理により分化を誘導された9N2.5胚性幹細胞中にトランスフェクトした。レチノイン酸処理後の様々な時間において細胞中のルシフェラーゼ活性を測定すると、プロモーターの転写活性は胚性幹細胞の分化の過程で低下するが、対照プロモーター(CMV)の活性は高いままであることが分かる(図14)。

【0142】

これらの結果すべてから、e n s - 1 遺伝子のコーディング配列の3'、すなわち転写プロモーター活性を有する領域が存在し、この転写活性は未分化ニワトリ胚性幹細胞に特異的であることが分かる。

【0143】

プロモーター2Sベクターにおいて5'RACE法を用い、e n s - 1 cDNA(配列番号1)の配列上の転写開始部位、およびこの転写開始部位の上流のTATAプロモーター型の配列も決定することができた。このプロモーターは配列番号1のヌクレオチド3111-3670に相当する。

生物学的材料の寄託

9N2.5細胞系は、2000年5月11日に識別番号I-2477として、ブダペスト条約の規定によりフランス、75724パリ・セデックス15、リユー・ドゥ・ドクトゥール・ルー25のCollection Nationale de Cultures des Microorganismes(CNCM)[National Collection of Cultures and Microorganisms]に寄託されており、実施例1に記載するように、DraIで線状化したROSA-geo導入遺伝子が電気穿孔により導入され、G418での選択およびガラクトシダーゼ活性に基づきにより単離されたニワトリ胚性幹細胞の系に相当する。

【0144】

9N2.5細胞を培養するのに使用できる細胞(STOマウス繊維芽細胞)もまた、SH-2477として2000年5月11日にCNCMに寄託された。

【0145】

参考文献

Buckholz(1993), Curr. Op. Biotechnology 4, 538.

Carter(1993), Curr. Op. Biotechnology 3, 533.

- Duck et al. (1990), *Biotechniques* 9, 142.
- Edwards and Aruffo (1993), *Curr. Op. Biotechnology* 4, 558.
- Epstein (1992), *Medecine/Sciences* 8, 902.
- Etches et al. (1996), *Science* 76, 1075 - 1083.
- Eyal-Giladi and Kovak (1976), *Dev. Biol.* 151, 575 - 585.
- Freidlich and Soriano (1991), *Genes & Development* 5, 1513 - 1523. 10
- Guatelli et al. (1990), *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874.
- Kelmer et al. (1981), *J. Embryol. Exp. Morph.* 64, 45 - 60.
- Kievitis et al. (1991), *J. Virol. Methods*, 35, 273.
- Kohler and Milstein (1975), *Nature* 256, 495.
- Kwoh et al. (1989), *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1173. 20
- Landegren et al. (1988), *Science* 241, 1077.
- Luckow (1993), *Curr. Op. Biotechnology* 4, 564.
- Matsui et al. (1992), *Cell* 70, 841 - 847.
- Matthews et al. (1988), *Anal. Biochem.*, 169, 1 - 25.
- Miele et al. (1983), *J. Mol. Biol.*, 171, 281.
- Neddleman and Wunsch (1970), *J. Mol. Biol.* 48:443.
- Olins and Lee (1993), *Curr. Op. Biotechnology* 30
y 4:520.
- Pain et al. (1996), *Development* 122, 2339 - 2348.
- Pain et al. (1999), *Cells Tissues Organs* 165, 212 - 219.
- Perricaudet et al. (1992), *La Recherche* 23:471.
- Pearson and Lipman (1988), *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444.
- Prowse and Greider (1995), *Pro. Natl. Acad. S* 40
ci. USA, 92, 4818 - 4822.
- Rohlmann et al. (1996), *Nature Biotech.* 14:1562.
- Rolf, A. et al. (1991), Berlin: Springer-Verlag.
- Rosner et al. (1990), *Nature* 354, 686 - 692.
- Sambrook et al. (1989), *Molecular cloning: a laboratory manual*, 第2版,
Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor
, ニューヨーク. 50

Segev (1992), Kessler C. Springer Verlag, Berlin, New-York, 197-205.

Shambloott et al. (1998), Pro. Natl. Aca. Sci. USA, 95, 13726-13731.

Smith and Waterman (1981) Ad. App. Math. 2:482.

Solter and Knowles (1978) Pro. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5565-5569.

Stewart and Yound (1984), Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 第2版, (1984).

Strickland et al. (1980), Cell 21, 347-355.

Temin (1986), Kucherlapati R. 編, Gene Transfer, ニューヨーク, Plenum Press, 149-187 「Retrovirus vectors for gene transfer」.

Walker (1992), Nucleic Acids Res. 20:1691.

【図面の簡単な説明】

【図1】

ES細胞を形質転換するのに使用される ROSA - - geoベクターの構造。

【図2】

レチノイン酸(+RA)、DMSO(+DMSO)または両者同時(+RA+DMSO)による分化誘導時の9N2.5細胞中の ROSA - - geo転写物の発現の RT-PCRによる解析。対照培地は誘導性因子を含有しない。

【図3】

レチノイン酸による分化誘導時の ROSA - - geo転写物の発現のノーザンブロットングによる解析。プロットを LacZプローブとハイブリダイズさせる。

【図4】

9N2.5細胞に対してキメラである胚における - ガラクトシダーゼ活性の顕示による ROSA - - geo導入遺伝子の発現の解析。

【図5】

キメラ胚における ROSA - - geo導入遺伝子の存在の PCR解析。DNAは9N2.5細胞、9N2.5細胞の移植により得られる48時間齢もしくは4日齢のキメラ胚、または48時間齢もしくは4日齢の対照胚のいずれかから抽出した。

【図6】

EcoRI (E) または DraI (D) で切断後の9N2.5細胞のゲノムDNAにおける ROSA - - geo導入遺伝子の存在のサザンブロットングによる検出。

【図7】

LacZプローブとのハイブリダイゼーションによる、 ROSA - - geo導入遺伝子を含む転写物の存在のノーザンブロットングによる検出。

【図8】

C1、S1およびS2プローブとのハイブリダイゼーション後の、正常ニワトリES細胞および9N2.5細胞における ens-1 遺伝子の発現のノーザンブロットング解析。ens-1 遺伝子の相補的DNAの構造(RS = 反復配列、ORF = オープンリーディングフレーム)。矢はハイブリダイゼーションに用いるC1、S1およびS2プローブを表す。

【図9】

正常ニワトリ胚性幹細胞、9N2.5細胞、各種発生段階および各種ニワトリ器官におけるニワトリ胚での ens-1 転写物の発現のノーザンブロットング解析。全RNAから単離した polyA+ RNAをC1もしくはS1プローブまたは対照の GAPDHプローブとプロット上でハイブリダイズさせた。

10

20

30

40

50

【図10】

in situ ハイブリダイゼーションによるニワトリ胚中の *ens-1* 転写物の発現の解析。

【図11】

ens-1 プライマー S1 (配列番号14) および *ens-1* プライマー AS1 (配列番号15) を用いて、各種鳥類のゲノムDNA 上で行ったPCR 増幅。

【図12】

レトロウイルス LTRの構造、*ens-1* 遺伝子に対して予想される構造、およびプロモーターを同定するために使用する2つの作製物の図。

【図13】

各種細胞系におけるプロモーターの活性 (S:センスプロモーター、AS: アンチセンスプロモーター)。

【図14】

ES細胞の分化の間のプロモーター2 (図12) の活性。

【図1】



FIG.1

【図2】

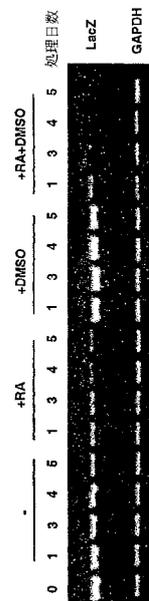


FIG.2

【 図 3 】

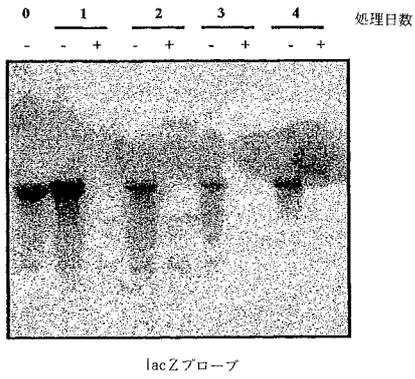


FIG.3

【 図 4 】

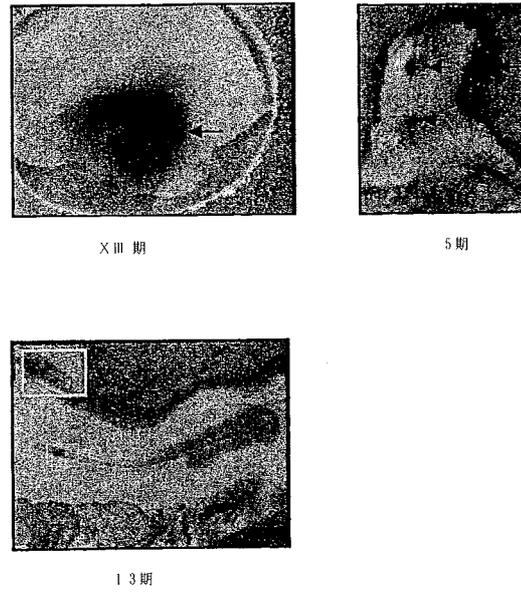


FIG.4

【 図 5 】

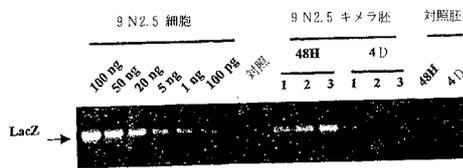


FIG.5

【 図 6 】

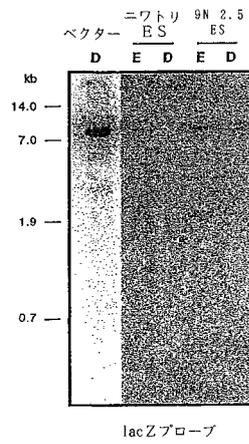


FIG.6

【 図 7 】

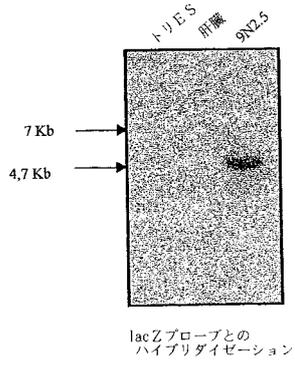


FIG.7

【 図 8 A 】

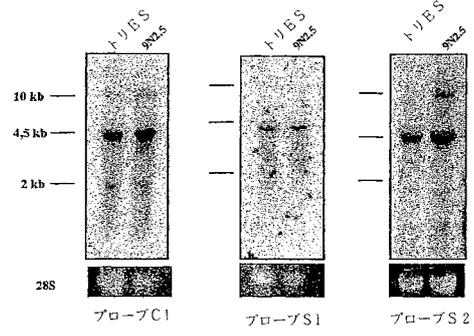


FIG.8A

【 図 8 B 】

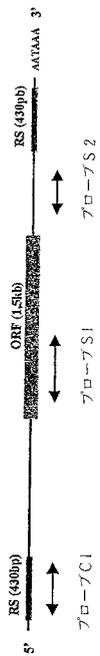


FIG.8B

【 図 9 】

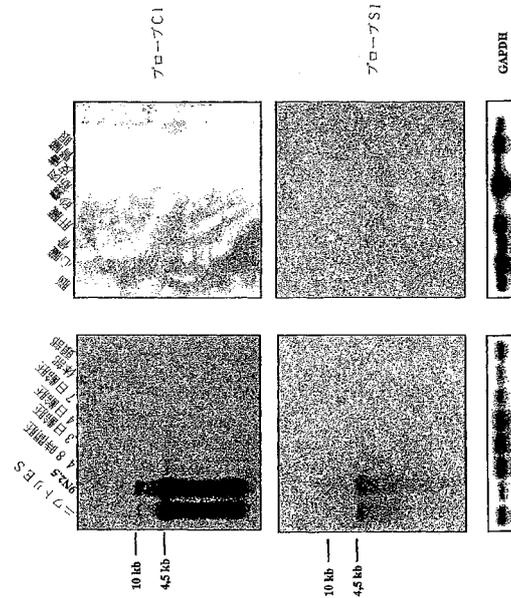


FIG. 9

【 図 1 0 】

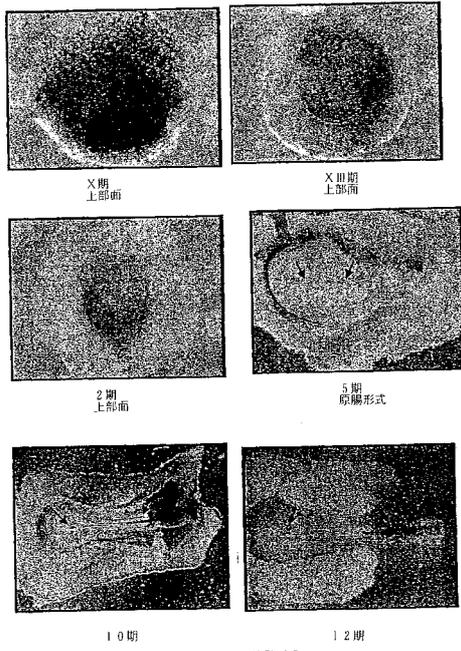


FIG.10

【 図 1 1 】

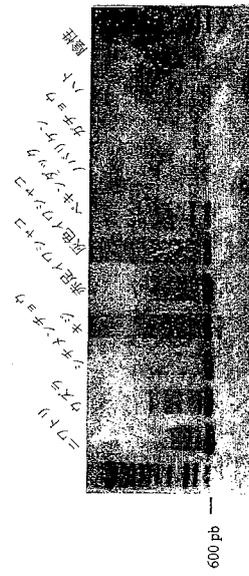


FIG.11

【 図 1 2 】

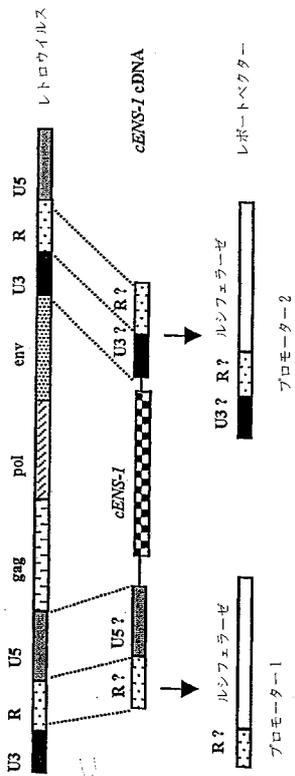


FIG.12

【 図 1 3 】

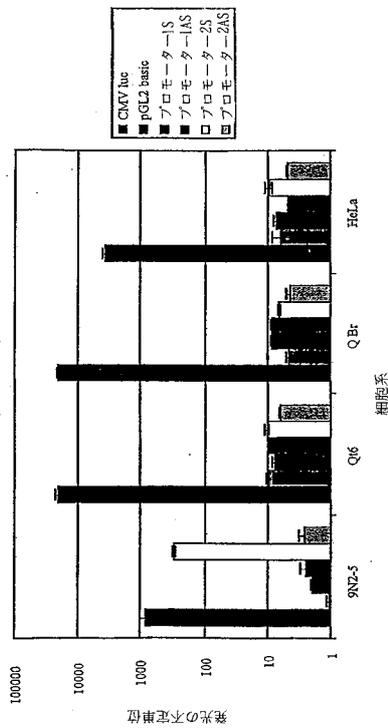


FIG.13

【 図 1 4 】

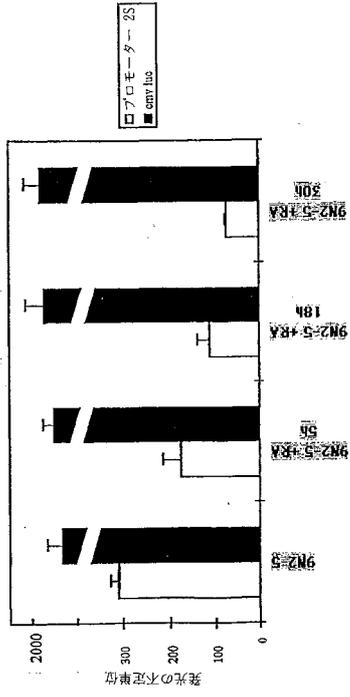


FIG.14

【国際公開パンフレット】

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
15 novembre 2001 (15.11.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/85938 A1(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12N 15/12, G01N
33/68, A01K 67/027, C07K 14/465, 16/18, A61K 39/395,
31/7088, 38/17, C12N 5/10, 15/63, C12Q 1/68Valérie [FR/FR], 12, rue Paul Bert, F-69003 Lyon (FR).
PAIN, Bertrand [FR/FR], 4 Place Bir Hakeim, F-69003
Lyon (FR). SAMARUT, Jacques [FR/FR], 169 bis, route
de Genas, F-69100 Villeurbanne (FR).(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/01207(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17
(FR).

(22) Date de dépôt international : 19 avril 2001 (19.04.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/06029 11 mai 2000 (11.05.2000) FR(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US)
: INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE [FR/FR], 147, rue de l'Université,
F-75007 Paris (FR). CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR], 3,
rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). ENS
- ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON
[FR/FR], 46, Allée d'Italie, F-69000 LYON (FR).(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).Publiée :
— avec rapport de recherche internationale(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
ACLOQUE, Hervé [FR/FR], 87, rue André Bollier,
F-69007 Lyon (FR). BIROT, Anne-Marie [FR/FR], 3, rue
du Planit, F-69110 Sainte-Foy-les-Lyon (FR). RISSON,En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

WO 01/85938 A1

(54) Title: MODIFIED ES CELLS AND ES CELL-SPECIFIC GENE

(54) Titre : CELLULES ES MODIFIÉES ET GÈNE SPÉCIFIQUE DE CELLULES ES

(57) Abstract: The invention concerns modified avian ES cells, specifically expressing an exogenous gene when they have a pluripo-
tent character. The invention also concerns a nucleic acid and a polypeptide specifically expressed in pluripotent avian cells, and
methods for detecting the pluripotent character of cells using said nucleic acid and polypeptide.(57) Abrégé : La présente invention concerne des cellules ES d'oiseau modifiées, exprimant spécifiquement un gène exogène
lorsqu'elles possèdent un caractère pluripotent. L'invention concerne également un acide nucléique et un polypeptide exprimés
spécifiquement dans les cellules d'oiseau pluripotentes, ainsi que des méthodes de détection du caractère pluripotent de cellules
mettant en œuvre ces acides nucléiques et polypeptide.

CELLULES ES MODIFIEES ET GENE SPECIFIQUE DE CELLULES ES

La présente invention concerne des cellules ES d'oiseau modifiées, exprimant spécifiquement un gène exogène lorsqu'elles possèdent un caractère pluripotent. L'invention concerne également un acide nucléique et un polypeptide exprimés spécifiquement dans les cellules d'oiseau pluripotentes, ainsi que des méthodes de détection du caractère pluripotent de cellules mettant en œuvre ces acide nucléique et polypeptide.

Les cellules ES sont des cellules pluripotentes isolées d'embryon très précoce, qui sont capables de participer à la morphogenèse de tous les tissus incluant le tissu germinale, après leur transplantation dans des embryons hôtes. Ces cellules ont d'abord été isolées chez la souris où elles sont très largement utilisées pour la création d'animaux mutants portant des modifications très ciblées de leur génome. Des cellules ES ont été isolées et caractérisées chez les oiseaux (Pain et col. 1996). Ces cellules peuvent être utilisées pour modifier le patrimoine génétique du poulet (Etches et al. 1996, Pain et col. 1999). Un milieu de culture permettant de maintenir le caractère pluripotent de ces cellules d'oiseaux a fait l'objet de la demande de brevet WO 96/12793.

La difficulté rencontrée par tous ceux qui veulent isoler des cellules ES en culture, concerne l'identification rapide de ces cellules et de leur caractère pluripotent. Plusieurs marqueurs cellulaires ont été utilisés comme l'expression d'une activité phosphatase alcaline (Strickland et col. 1980), l'expression d'épitopes antigéniques (Kemler et col. 1981, Solter et Knowles 1978), l'expression de protéines spécifiques comme OCT-3 (Rosner et col. 1990), l'expression d'une activité télomérase (Prowse et Greider 1995). Les protéines OCT-3, REX-1, UTF-1 entre autres n'ont été identifiées jusqu'à présent que chez la souris. La vérification ultime du caractère pluripotent repose sur l'analyse des potentialités morphogénétiques de ces cellules après leur greffe dans des embryons hôtes, ce qui représente un test très lourd.

Une autre difficulté rencontrée avec la culture des cellules ES en culture comprend l'obtention de populations cellulaires d'un degré d'hétérogénéité faible et satisfaisant, et le problème du contrôle de la croissance en culture de cellules non-

pluripotentes. En effet, un problème particulier associé à la présence continue de certains types cellulaires différenciés, c'est-à-dire que ces cellules sont capables d'éliminer les cellules ES de la culture en induisant leur différenciation ou leur mort cellulaire programmée.

5 La présente invention se propose de simplifier l'identification du caractère pluripotent de cellules d'oiseaux en culture, par la divulgation d'une séquence nucléique (gène *ens-1*) exprimée spécifiquement et sélectivement par les cellules pluripotentes.

10 Ainsi, la présente invention a pour objet un acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléique choisie dans le groupe de séquences suivantes :

- a) SEQ ID N° 1, ou le fragment correspondant aux nucléotides 1409-2878 de SEQ ID N° 1 ;
- 15 b) la séquence d'un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs d'une séquence choisie parmi SEQ ID N° 1 en particulier le fragment correspondant aux nucléotides 3111-3670 de SEQ ID N° 1 ;
- c) une séquence nucléique présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, après alignement optimal avec une séquence définie en a) ou b), ladite séquence n'étant pas définie par les 20 nucléotides 2308-2927 ou 3094-3753 de SEQ ID N° 1 ;
- d) une séquence nucléique s'hybridant dans des conditions de forte stringence avec une séquence nucléique définie en a) ou b) , ladite séquence n'étant pas définie par les nucléotides 2308-2927 25 ou 3094-3753 de SEQ ID N° 1 ;
- e) la séquence complémentaire ou la séquence d'ARN correspondant à une séquence telle que définie en a), b), c) ou d).

De préférence, la base présente en 2773 de SEQ ID N° 1 est un « t », le codon correspondant codant alors pour une thréonine.

30 La séquence d'acides nucléiques selon l'invention définie en c) présente un pourcentage d'identité d'au moins 80 % après alignement optimal avec une séquence telle que définie en a) ou b) ci-dessus, de préférence 90 %, de façon la

plus préférée 98 %. De préférence, la séquence définie en c), d) ou en e) est comparée à une des séquences définies en a).

Par acide nucléique, séquence nucléique ou d'acide nucléique, polynucléotide, oligonucléotide, séquence de polynucléotide, séquence
5 nucléotidique, termes qui seront employés indifféremment dans la présente description, on entend désigner un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique, comportant ou non des nucléotides non naturels, et pouvant correspondre aussi bien à un ADN double brin, un ADN simple brin que des produits de transcription
10 desdits ADNs. Ainsi, les séquences nucléiques selon l'invention englobent également les PNA (Peptid Nucleic Acid), ou analogues.

Il doit être compris que la présente invention ne concerne pas les séquences nucléotidiques dans leur environnement chromosomique naturel, c'est-à-dire à l'état naturel. Il s'agit de séquences qui ont été isolées et/ou purifiées, c'est-à-dire qu'elles
15 ont été prélevées directement ou indirectement, par exemple par copie, leur environnement ayant été au moins partiellement modifié. On entend ainsi également désigner les acides nucléiques obtenus par synthèse chimique.

Par « pourcentage d'identité » entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés au sens de la présente invention, on entend désigner un
20 pourcentage de nucléotides ou de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. On entend désigner par "meilleur alignement" ou "alignement optimal", l'alignement pour lequel le pourcentage d'identité déterminé
25 comme ci-après est le plus élevé. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison étant réalisée par segment ou par « fenêtre de comparaison » pour identifier et comparer les régions locales de similarité de séquence. L'alignement
30 optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981), au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Needleman et Wunsch (1970), au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988), au

moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI). Afin d'obtenir l'alignement optimal, on utilise de préférence le programme BLAST, avec la

5 matrice BLOSUM 62. On peut également utiliser les matrices PAM ou PAM250.

Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés est déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière optimale, la séquence d'acides nucléiques ou d'acides aminés à comparer pouvant comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de

10 référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou le résidu d'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions comparées et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le

15 pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

Par séquences nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, après alignement optimal avec une séquence de référence, on entend désigner les séquences nucléiques présentant, par rapport à la séquence nucléique de référence, certaines

20 modifications comme en particulier une délétion, une troncation, un allongement, une fusion chimérique, et/ou une substitution, notamment ponctuelle, et dont la séquence nucléique présente au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, d'identité après alignement optimal avec la séquence nucléique de référence. Il s'agit de préférence de séquences dont les séquences complémentaires

25 sont susceptibles de s'hybrider spécifiquement avec la séquence SEQ ID N° 1 de l'invention. De préférence, les conditions d'hybridation spécifiques ou de forte stringence seront telles qu'elles assurent au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 % d'identité après alignement optimal entre l'une des deux séquences et la séquence complémentaire de l'autre.

30 Une hybridation dans des conditions de forte stringence signifie que les conditions de température et de force ionique sont choisies de telle manière qu'elles permettent le maintien de l'hybridation entre deux fragments d'ADN complémentaires. A titre illustratif, des conditions de forte stringence de l'étape

d'hybridation aux fins de définir les fragments polynucléotidiques décrits ci-dessus, sont avantageusement les suivantes.

L'hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN est réalisée en deux étapes : (1) préhybridation à 42°C pendant 3 heures en tampon phosphate (20 mM, pH 7,5) contenant 5 x SSC (1 x SSC correspond à une solution 0,15 M NaCl + 0,015 M citrate de sodium), 50 % de formamide, 7 % de sodium dodécyl sulfate (SDS), 10 x Denhardt's, 5 % de dextran sulfate et 1 % d'ADN de sperme de saumon ; (2) hybridation proprement dite pendant 20 heures à une température dépendant de la taille de la sonde (i.e. : 42°C, pour une sonde de taille > 100 nucléotides) suivie de 2 lavages de 20 minutes à 20°C en 2 x SSC + 2 % SDS, 1 lavage de 20 minutes à 20°C en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS. Le dernier lavage est pratiqué en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS pendant 30 minutes à 60°C pour une sonde de taille > 100 nucléotides. Les conditions d'hybridation de forte stringence décrites ci-dessus pour un polynucléotide de taille définie, peuvent être adaptées par l'homme du métier pour des oligonucléotides de taille plus grande ou plus petite, selon l'enseignement de Sambrook et al., 1989.

Parmi les séquences nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, après alignement optimal avec la séquence selon l'invention, on préfère également les séquences nucléiques variantes de SEQ ID N° 1, ou de ses fragments, c'est-à-dire l'ensemble des séquences nucléiques correspondant à des variants alléliques, c'est-à-dire des variations individuelles de la séquence SEQ ID N° 1. Ces séquences mutées naturelles correspondent à des polymorphismes présents chez les oiseaux, en particulier chez les galliformes. De préférence, la présente invention concerne les séquences nucléiques variantes dans lesquelles les mutations conduisent à une modification de la séquence d'acides aminés du polypeptide, ou de ses fragments, codés par la séquence normale de SEQ ID N° 1.

On entend également désigner par séquence nucléique variante tout ARN ou ADNc résultant d'une mutation et/ou variation d'un site d'épissage de la séquence nucléique génomique dont l'ADNc a pour séquence SEQ ID N° 1.

L'invention concerne de préférence un acide nucléique purifié ou isolé selon la présente invention, caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué de la

séquence SEQ ID N° 1, de sa séquence complémentaire ou de la séquence de l'ARN correspondant à SEQ ID N° 1.

De préférence, les fragments s'hybridant à l'acide nucléique selon l'invention, ou homologue audit acide nucléique ne sont pas définis par les nucléotides 2308-2927 ou 3094-3753 de SEQ ID N° 1, qui correspondent approximativement à des EST (numéros GenBank AJ397754 et AJ393785) qui ont été obtenues par séquençage systématique et sur lesquelles aucune donnée notamment fonctionnelle n'a été fournie. Pour cette raison, ces divulgations doivent être considérées comme des divulgations accidentelles.

Les amorces ou sondes, caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence d'un acide nucléique selon l'invention, font également partie de l'invention.

Ainsi, la présente invention concerne également les amorces ou les sondes selon l'invention qui peuvent permettre en particulier de mettre en évidence ou de discriminer les séquences nucléiques variantes, ou d'identifier la séquence génomique du gène dont l'ADNc est représenté par SEQ ID N° 1, en utilisant notamment une méthode d'amplification telle que la méthode PCR, ou une méthode apparentée.

L'invention concerne également l'utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'invention comme sonde ou amorce, pour la détection, l'identification, le dosage et/ou l'amplification de séquences d'acide nucléique.

L'invention concerne également l'utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'invention comme oligonucléotide sens ou antisens.

Selon l'invention, les polymucléotides pouvant être utilisés comme sonde ou comme amorce dans des procédés de détection, d'identification, de dosage ou d'amplification de séquence nucléique, présentent une taille minimale de 15 bases, de préférence de 20 bases, ou mieux de 25 à 30 bases.

Les sondes et amorces selon l'invention peuvent être marquées directement ou indirectement par un composé radioactif ou non radioactif par des méthodes bien connues de l'homme du métier, afin d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable.

Les séquences de polynucléotides selon l'invention non marquées peuvent être utilisées directement comme sonde ou amorce.

Les séquences sont généralement marquées pour obtenir des séquences utilisables pour de nombreuses applications. Le marquage des amorces ou des sondes selon l'invention est réalisé par des éléments radioactifs ou par des molécules non radioactives.

Parmi les isotopes radioactifs utilisés, on peut citer le ^{32}P , le ^{33}P , le ^{35}S , le ^3H ou le ^{125}I . Les entités non radioactives sont sélectionnées parmi les ligands tels la biotine, l'avidine, la streptavidine, la dioxygénine, les haptènes, les colorants, les agents luminescents tels que les agents radioluminescents, chémoluminescents, bioluminescents, fluorescents, phosphorescents.

Les polynucléotides selon l'invention peuvent ainsi être utilisés comme amorce et/ou sonde dans des procédés mettant en oeuvre notamment la technique de PCR (amplification en chaîne par polymérase) (Rolfs et al., 1991). Cette technique nécessite le choix de paires d'amorces oligonucléotidiques encadrant le fragment qui doit être amplifié. On peut, par exemple, se référer à la technique décrite dans le brevet américain U.S. N° 4,683,202. Les fragments amplifiés peuvent être identifiés, par exemple après une électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide, ou après une technique chromatographique comme la filtration sur gel ou la chromatographie échangeuse d'ions, puis séquencés. La spécificité de l'amplification peut être contrôlée en utilisant comme amorces les séquences nucléotidiques de polynucléotides de l'invention et comme matrices, des plasmides contenant ces séquences ou encore les produits d'amplification dérivés. Les fragments nucléotidiques amplifiés peuvent être utilisés comme réactifs dans des réactions d'hybridation afin de mettre en évidence la présence, dans un échantillon biologique, d'un acide nucléique cible de séquence complémentaire à celle desdits fragments nucléotidiques amplifiés.

L'invention vise également les acides nucléiques susceptibles d'être obtenus par amplification à l'aide d'amorces selon l'invention.

D'autres techniques d'amplification de l'acide nucléique cible peuvent être avantageusement employées comme alternative à la PCR (PCR-like) à l'aide de couple d'amorces de séquences nucléotidiques selon l'invention. Par PCR-like on entend désigner toutes les méthodes mettant en oeuvre des reproductions directes ou

indirectes des séquences d'acides nucléiques, ou bien dans lesquelles les systèmes de marquage ont été amplifiés, ces techniques sont bien entendu connues. En général il s'agit de l'amplification de l'ADN par une polymérase ; lorsque l'échantillon d'origine est un ARN il convient préalablement d'effectuer une
5 transcription reverse. Il existe actuellement de très nombreux procédés permettant cette amplification, comme par exemple la technique SDA (Strand Displacement Amplification) ou technique d'amplification à déplacement de brin (Walker et al., 1992), la technique TAS (Transcription-based Amplification System) décrite par Kwoh et al. (1989), la technique 3SR (Self-Sustained Sequence Replication) décrite par
10 Guatelli et al. (1990), la technique NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) décrite par Kievitis et al. (1991), la technique TMA (Transcription Mediated Amplification), la technique LCR (Ligase Chain Reaction) décrite par Landegren et al. (1988), la technique de RCR (Repair Chain Reaction) décrite par Segev (1992), la technique CPR (Cycling Probe Reaction) décrite par Duck et al.
15 (1990), la technique d'amplification à la Q- β -réplicase décrite par Miele et al. (1983). Certaines de ces techniques ont depuis été perfectionnées.

Dans le cas où le polynucléotide cible à détecter est un ARNm, on utilise avantageusement, préalablement à la mise en oeuvre d'une réaction d'amplification à l'aide des amorces selon l'invention ou à la mise en oeuvre d'un procédé de
20 détection à l'aide des sondes de l'invention, une enzyme de type transcriptase inverse afin d'obtenir un ADNc à partir de l'ARNm contenu dans l'échantillon biologique. L'ADNc obtenu servira alors de cible pour les amorces ou les sondes mises en oeuvre dans le procédé d'amplification ou de détection selon l'invention.

La technique d'hybridation de sondes peut être réalisée de manières diverses
25 (Matthews et al., 1988). La méthode la plus générale consiste à immobiliser l'acide nucléique extrait des cellules de différents tissus ou de cellules en culture sur un support (tels que la nitrocellulose, le nylon, le polystyrène) et à incuber, dans des conditions bien définies, l'acide nucléique cible immobilisé avec la sonde. Après l'hybridation, l'excès de sonde est éliminé et les molécules hybrides formées sont
30 détectées par la méthode appropriée (mesure de la radioactivité, de la fluorescence ou de l'activité enzymatique liée à la sonde).

Selon un autre mode de mise en oeuvre des sondes nucléiques selon l'invention, ces dernières peuvent être utilisées comme sondes de capture. Dans ce

cas, une sonde, dite « sonde de capture », est immobilisée sur un support et sert à capturer par hybridation spécifique l'acide nucléique cible obtenu à partir de l'échantillon biologique à tester et l'acide nucléique cible est ensuite détecté grâce à une seconde sonde, dite « sonde de détection », marquée par un élément facilement
5 détectable.

Parmi les fragments d'acides nucléiques intéressants, il faut ainsi citer en particulier les oligonucléotides anti-sens, c'est-à-dire dont la structure assure, par hybridation avec la séquence cible, une inhibition de l'expression du produit correspondant. Il faut également citer les oligonucléotides sens qui, par interaction
10 avec des protéines impliquées dans la régulation de l'expression du produit correspondant, induiront soit une inhibition, soit une activation de cette expression.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'acide nucléique selon l'invention code pour un polypeptide possédant un fragment continu d'au moins 200 acides aminés de la protéine SEQ ID N° 2, de préférence 300 acides aminés, de la façon la plus préférée pour la protéine SEQ ID N° 2. Ce polypeptide
15 est également un objet de l'invention.

En effet, la présente invention concerne également un polypeptide isolé caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi :

- a) un polypeptide de séquence SEQ ID N° 2 ;
- 20 b) un polypeptide variant d'un polypeptide de séquence SEQ ID N° 2 ;
- c) un polypeptide homologue à un polypeptide défini en a) ou b), comportant au moins 80 % d'identité avec ledit polypeptide de a) ;
- 25 d) un fragment d'au moins 15 acides aminés consécutifs d'un polypeptide défini en a), b) ou c) ;
- e) un fragment biologiquement actif d'un polypeptide défini en a), b) ou c).

De préférence, l'acide aminé en position 455 est une thréonine.

30 Par « polypeptide », on entend, au sens de la présente invention, désigner des protéines ou des peptides.

Par « fragment biologiquement actif », on entend un fragment possédant la même activité biologique que le fragment peptidique dont il est déduit, de

préférence dans le même ordre de grandeur (à un facteur 10 près). Un fragment biologiquement actif de la protéine ENS-1 consiste donc en un polypeptide issu de SEQ ID N° 2 qui pourrait posséder également un rôle dans le caractère de pluripotente des cellules ES.

5 De préférence un polypeptide selon l'invention est un polypeptide constitué de la séquence SEQ ID N° 2 (correspondant à la protéine codée par le gène *ens-1*) ou d'une séquence possédant au moins 80 % d'identité avec SEQ ID N° 2 après alignement optimal.

10 La séquence du polypeptide présente un pourcentage d'identité d'au moins 80 % après alignement optimal avec la séquence SEQ ID N° 2, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %.

15 Par polypeptide dont la séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, après alignement optimal avec une séquence de référence, on entend désigner les polypeptides présentant certaines modifications par rapport au polypeptide de référence, comme en particulier une ou plusieurs délétions, troncations, un allongement, une fusion chimérique, et/ou une ou plusieurs substitutions.

20 Parmi les polypeptides dont la séquence d'acides aminés présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, de façon plus préférée 98 %, après alignement optimal avec la séquence SEQ ID N° 2 ou avec l'un de ses fragments selon l'invention, on préfère les polypeptides variants codés par les séquences nucléiques variantes telles que précédemment définies, en particulier les polypeptides dont la séquence d'acides aminés présente au moins une mutation correspondant notamment à une troncation, délétion, substitution et/ou addition d'au
25 moins un résidu d'acide aminé par rapport à la séquence SEQ ID N° 2 ou avec l'un de ses fragments, de manière plus préférée les polypeptides variants présentant une mutation liée à une perte de caractère pluripotent des cellules les contenant.

30 La présente invention concerne également les vecteurs de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique ou codant pour un polypeptide selon l'invention. Un tel vecteur peut également contenir les éléments nécessaires à l'expression et éventuellement à la sécrétion du polypeptide dans une cellule hôte. Une telle cellule hôte est également un objet de l'invention.

Les vecteurs caractérisés en ce qu'ils comportent une séquence de promoteur et/ou de régulateur selon l'invention, font également partie de l'invention.

5 Lesdits vecteurs comportent de préférence un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que des régions appropriées de régulation de la transcription. Ils doivent pouvoir être maintenus de façon stable dans la cellule et peuvent éventuellement posséder des signaux particuliers spécifiant la sécrétion de la protéine traduite.

10 Ces différents signaux de contrôle sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences d'acide nucléique selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à répllication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi.

15 Parmi les systèmes à répllication autonome, on utilise de préférence en fonction de la cellule hôte, des systèmes de type plasmidique ou viral, les vecteurs viraux pouvant notamment être des adénovirus (Perricaudet et al., 1992), des rétrovirus, des lentivirus, des poxvirus ou des virus herpétiques (Epstein et al., 1992). L'homme du métier connaît les technologies utilisables pour chacun de ces systèmes.

20 Lorsque l'on souhaite l'intégration de la séquence dans les chromosomes de la cellule hôte, on peut utiliser par exemple des systèmes de type plasmidique ou viral ; de tels virus sont, par exemple, les rétrovirus (Temin, 1986), ou les AAV (Carter, 1993).

25 Parmi les vecteurs non viraux, on préfère les polynucléotides nus tels que l'ADN nu ou l'ARN nu selon la technique développée par la société VICAL, les chromosomes artificiels de bactérie (BAC, bacterial artificial chromosome), les chromosomes artificiels de levure (YAC, yeast artificial chromosome) pour l'expression dans la levure, les chromosomes artificiels de souris (MAC, mouse artificial chromosome) pour l'expression dans les cellules murines et de manière préférée les chromosomes artificiels d'homme (HAC, human artificial chromosome) pour l'expression dans les cellules humaines.

30 Dans les cellules d'oiseaux, on pourra utiliser comme vecteur d'expression des rétrovirus, des adénovirus aviaires, des poxvirus ou bien de l'ADN introduit par transfection ou électroporation.

De tels vecteurs sont préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standard, telles que par exemple la lipofection, l'électroporation, le choc thermique, la transformation après perméabilisation chimique de la membrane, la fusion cellulaire.

L'invention comprend en outre les cellules hôtes, notamment les cellules eucaryotes et procaryotes, transformées par les vecteurs selon l'invention ainsi que les animaux transgéniques, de préférence les oiseaux ou mammifères, excepté l'Homme, comprenant une desdites cellules transformées selon l'invention. En particulier, l'invention comprend les animaux comprenant le gène *ens-1* présentant des marqueurs génétiques insérés dans celui-ci.

Parmi les cellules utilisables aux sens de la présente invention, on peut citer les cellules bactériennes (Olins et Lee, 1993), mais aussi les cellules de levure (Buckholz, 1993), de même que les cellules animales, en particulier les cultures de cellules de mammifères (Edwards et Aruffo, 1993), et notamment les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO). On peut citer également les cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant par exemple en œuvre des baculovirus (Luckow, 1993). Un hôte cellulaire préféré pour l'expression des protéines de l'invention est constitué par les cellules COS.

Parmi les cellules d'oiseaux utilisables, on peut citer les cellules LMH d'hématome de poulet, les cellules immortalisées de caille QT6, les fibroblastes primaires ou immortalisés de poulet, de caille, de canard.

L'invention concerne également une cellule hôte contenant un acide nucléique selon l'invention, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule ES d'oiseau modifiée en outre par introduction d'un gène exogène, ledit gène exogène étant uniquement et spécifiquement exprimé lorsque ladite cellule est maintenue à l'état pluripotent. De façon préférée, ledit gène exogène est un gène rapporteur, choisi parmi lacZ, GFP, luciférase, ROSA- β -geo, un gène de résistance à un antibiotique en particulier les gènes de résistance à la néomycine, l'hygromycine, la phléomycine, la puromycine).

Ces cellules selon l'invention sont très utiles pour le criblage de composés permettant d'induire la différenciation de cellules pluripotentes, ou de milieu pour la culture de cellules tout en maintenant leur caractère pluripotent.

Une autre cellule hôte d'intérêt selon l'invention consiste en une cellule d'oiseau contenant un acide nucléique selon l'invention, modifiée en outre par introduction d'un acide nucléique exogène, ledit acide nucléique exogène étant intégré dans ledit acide nucléique selon l'invention. Selon un mode de réalisation 5 préférée de l'invention, ledit acide nucléique exogène est un gène d'intérêt thérapeutique, éventuellement précédé d'un promoteur spatio-temporelle et/ou de séquences terminatrices. Dans un autre mode de réalisation, ledit acide nucléique exogène est un marqueur génétique, qui peut être choisi parmi lacZ, GFP, phosphatase alcaline, thymidine kinase, gènes de résistance aux antibiotiques 10 (parmi lesquels néomycine, hygromycine, phléomycine, puromycine).

De façon préférée, les cellules d'oiseau hôtes précédemment décrites caractérisées en ce que ledit oiseau appartient à l'ordre des Galliformes, et est en particulier un poulet ou une caille.

Dans ce cas, on intègre ledit gène rapporteur sous le contrôle du promoteur 15 du gène *ens-1* et/ou on intègre ledit acide nucléique exogène (gène d'intérêt thérapeutique et/ou marqueur génétique) dans le gène *ens-1*.

On peut ainsi utiliser le promoteur identifié dans la présente demande, correspondant aux nucléotides 3111-3670 de SEQ ID N° 1. On peut également modifier ce promoteur, en réduisant le nombre de nucléotides, ou en introduisant 20 de nouveaux, voire en effectuant des mutations sur certains nucléotides. L'homme du métier connaît les protocoles pour effectuer de telles modifications, ainsi que pour tester le promoteur ainsi obtenu pour l'expression dans les cellules souches pluripotentes. On a ainsi montré en particulier que l'on peut insérer une guanine en position 3654 de SEQ ID N° 1, sans perdre l'activité promotrice du fragment ainsi 25 modifié.

Ainsi, l'invention concerne aussi l'utilisation d'un acide nucléique correspondant aux nucléotides 3111-3670 de SEQ ID N° 1 en tant que promoteur d'un gène d'intérêt pour une expression spécifique dudit gène d'intérêt dans des 30 cellules pluripotentes aviaires. Un gène d'intérêt est soit un gène marqueur (luciférase, GFP, β -galactosidase...), soit peut être un gène codant pour une protéine telle un facteur de croissance, une cytokine, une protéine impliquée dans la reconnaissance immunitaire, une protéine à intérêt thérapeutique... Il est intéressant

de noter que la « TATA box » a également été identifiée, qui est un objet de l'invention, aux nucléotides 3645-3651 de SEQ ID N° 1.

Une cellule préférée selon l'invention est une cellule 9N2.5, déposée à la Collection Nationale de Culture des Microorganismes le 11 Mai 2000 sous le
5 numéro d'ordre I-2477.

Les cellules selon l'invention sont de préférence des cellules ES pluripotentes, mais il doit être compris que l'invention concerne aussi les cellules d'oiseau différenciées, dérivant d'une cellule ES selon l'invention. on peut en particulier effectuer la différenciation de ces cellules en utilisant de l'acide
10 rétinolique, selon les enseignements de la demande de brevet WO 96/12793.

L'invention concerne également les animaux transgéniques qui contiennent une cellule selon l'invention. Parmi les animaux selon l'invention, on préfère les oiseaux, en particulier les membres de l'ordre des Galliformes. Ces oiseaux transgéniques seront particulièrement intéressants pour l'étude de modifications
15 dans le gène *ens-1* ou dans son promoteur.

On peut également introduire un acide nucléique selon l'invention dans des oiseaux et d'autres animaux tels que les rongeurs, en particulier les souris, les rats ou les lapins, afin d'exprimer un polypeptide selon l'invention.

Ces animaux transgéniques sont obtenus par exemple par recombinaison
20 homologue sur cellules souches embryonnaires, transfert de ces cellules souches à des embryons, sélection des chimères affectées au niveau des lignées reproductrices, et croissance desdites chimères. Ils peuvent aussi être obtenus par microinjection d'ADN nu dans l'ovocyte fécondé.

Les animaux transgéniques selon l'invention peuvent ainsi surexprimer le
25 gène codant pour la protéine selon l'invention, ou leur gène homologue, ou exprimer ledit gène dans lequel est introduite une mutation ou bien exprimer un transgène comportant des portions du gène *ens-1* associées à des séquences codantes destinées à produire une protéine.

Alternativement, les oiseaux transgéniques selon l'invention peuvent être
30 rendus déficients pour le gène codant pour le polypeptide de séquence SEQ ID N° 2, ou un gènes homologues, par inactivation à l'aide du système LOXP/CRE recombinase (Rohlmann et al., 1996) ou de tout autre système d'inactivation de l'expression de ce gène.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'invention pour la synthèse de polypeptides recombinants.

La méthode de production d'un polypeptide de l'invention sous forme recombinante, elle-même comprise dans la présente invention, se caractérise en ce
5 que l'on cultive les cellules transformées, notamment les cellules ou mammifères de la présente invention, dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide recombinant codé par une séquence d'acide nucléique selon l'invention, et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.

Les polypeptides recombinants, caractérisés en ce qu'ils sont susceptibles
10 d'être obtenus par ladite méthode de production, font également partie de l'invention.

Les polypeptides recombinants obtenus comme indiqué ci-dessus, peuvent aussi bien se présenter sous forme glycosylée que non glycosylée et peuvent présenter ou non la structure tertiaire naturelle.

15 Les séquences des polypeptides recombinants peuvent être également modifiées afin d'améliorer leur solubilité, en particulier dans les solvants aqueux.

De telles modifications sont connues de l'homme du métier comme par exemple la délétion de domaines hydrophobes ou la substitution d'acides aminés hydrophobes par des acides aminés hydrophiles.

20 Ces polypeptides peuvent être produits à partir des séquences d'acide nucléique définies ci-dessus, selon les techniques de production de polypeptides recombinants connues de l'homme du métier. Dans ce cas, la séquence d'acide nucléique utilisée est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire.

25 Un système efficace de production d'un polypeptide recombinant nécessite de disposer d'un vecteur et d'une cellule hôte selon l'invention.

Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la réplique
30 et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

Les procédés utilisés pour la purification d'un polypeptide recombinant sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant peut être purifié à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des

méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques, etc...

Les polypeptides selon la présente invention peuvent aussi être obtenus par
5 synthèse chimique en utilisant l'une des nombreuses synthèses peptidiques connues, par exemple les techniques mettant en œuvre des phases solides (voir notamment Stewart et al., 1984) ou des techniques utilisant des phases solides partielles, par condensation de fragments ou par une synthèse en solution classique.

Les polypeptides obtenus par synthèse chimique et pouvant comporter des
10 acides aminés non naturels correspondants sont également compris dans l'invention.

Les anticorps mono- ou polyclonaux ou leurs fragments, anticorps chimériques ou immunoconjugués, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon l'invention, font partie de l'invention.

15 Des anticorps polyclonaux spécifiques peuvent être obtenus à partir d'un sérum d'un animal immunisé contre les polypeptides selon l'invention, notamment produit par recombinaison génétique ou par synthèse peptidique, selon les modes opératoires usuels.

On note notamment l'intérêt d'anticorps reconnaissant de façon spécifique
20 certains polypeptides, variants, ou leurs fragments immunogènes, selon l'invention.

Les anticorps mono- ou polyclonaux ou leurs fragments, anticorps chimériques ou immunoconjugués, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement le polypeptide de séquence SEQ ID N° 2 sont particulièrement préférés.

25 Les anticorps monoclonaux spécifiques peuvent être obtenus selon la méthode classique de culture d'hybridomes décrite par Köhler et Milstein (1975).

Les anticorps selon l'invention sont, par exemple, des anticorps chimériques, des anticorps humanisés, des fragments Fab ou F(ab')₂. Ils peuvent également se présenter sous forme d'immunoconjugués ou d'anticorps marqués afin
30 d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable.

L'invention concerne également des méthodes pour la détection et/ou la purification d'un polypeptide selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles mettent en œuvre un anticorps selon l'invention.

L'invention comprend en outre des polypeptides purifiés, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par une méthode selon l'invention.

Par ailleurs, outre leur utilisation pour la purification des polypeptides, les anticorps de l'invention, en particulier les anticorps monoclonaux, peuvent également être utilisés pour la détection de ces polypeptides dans un échantillon biologique.

Ils constituent ainsi un moyen d'analyse immunocytochimique ou immunohistochimique de l'expression des polypeptides selon l'invention, notamment le polypeptide de séquence SEQ ID N° 2 ou l'un de ses variants, sur des coupes de tissus spécifiques, par exemple par immunofluorescence, marquage à l'or, immunoconjugés enzymatiques.

Ils peuvent permettre notamment de mettre en évidence l'expression de ces polypeptides dans les tissus ou prélèvements biologiques.

Plus généralement, les anticorps de l'invention peuvent être avantageusement mis en œuvre dans toute situation où l'expression d'un polypeptide selon l'invention, normal ou muté, doit être observée.

Ainsi, un procédé de détection d'un polypeptide selon l'invention dans un échantillon biologique, comprenant les étapes de mise en contact de l'échantillon biologique avec un anticorps selon l'invention et de mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé est également un objet de l'invention, ainsi qu'une trousse permettant de mettre en œuvre un tel procédé. Une telle trousse contient en particulier :

- a) un anticorps monoclonal ou polyclonal selon l'invention ;
- b) éventuellement des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à la réaction immunologique ;
- c) les réactifs permettant la détection du complexe antigène-anticorps produit lors de la réaction immunologique.

Ces anticorps peuvent être obtenus directement à partir de sérum humain, ou à partir d'animaux immunisés avec des polypeptides selon l'invention, puis « humanisés ».

Les anticorps selon l'invention sont très utiles pour déterminer la présence du polypeptide SEQ ID N° 2, et permettent ainsi de déterminer le caractère pluripotent d'une cellule ES d'oiseau.

Un procédé de détermination du caractère pluripotent d'une cellule ES d'oiseau, caractérisé en ce qu'on détermine la présence d'un produit d'expression du gène correspondant à SEQ ID N° 1 ou de l'ARNm de SEQ ID N° 1 est également un objet l'invention.

5 En effet, l'invention divulgue la séquence du gène *ens-1*, qui est spécifiquement exprimé dans les cellules ES d'oiseau, en particulier des Galliformes, lorsque celles-ci sont pluripotentes. Les méthodes de détection de l'expression d'un gène appliquées à ce gène permettent donc de connaître rapidement la nature des cellules étudiées.

10 En particulier, comme écrit ci-dessus, on peut détecter le produit d'expression du gène, en utilisant par exemple des anticorps selon l'invention, par Western Blot ou d'autres méthodes décrites précédemment.

On peut aussi effectuer la détection de l'ARNm de SEQ ID N° 1 par Northern Blot ou par RT-PCR en utilisant une sonde ou des amorces selon
15 l'invention.

La détection de l'expression de ce gène peut également être effectuée en utilisant une puce à ADN ou une puce à protéine, qui contiennent respectivement un acide nucléique ou un polypeptide selon l'invention. De telles puces sont également objets de l'invention.

20 Une puce à protéines selon l'invention permet aussi l'étude des interactions entre les polypeptides selon l'invention et d'autres protéines ou des composés chimiques, et peut ainsi être utile pour le criblage de composés interagissant avec les polypeptides selon l'invention.

Les Demanderesses ont montré que le gène *ens-1* est trouvé
25 uniquement dans les oiseaux de la famille des Galliformes. Ainsi, l'invention concerne également un procédé de classification de l'appartenance d'un oiseau à l'ordre des Galliformes, caractérisé en ce que l'on détecte, dans le génome dudit oiseau, la présence d'un acide nucléique selon l'invention, en particulier la présence de SEQ ID N° 1.

30 Cette propriété que le gène *ens-1* soit trouvé uniquement chez les Galliformes permet de définir un procédé de détermination de la présence d'un échantillon provenant d'un oiseau de l'ordre des Galliformes dans un échantillon

alimentaire, caractérisé en ce que l'on détecte, dans ledit échantillon, la présence d'un acide nucléique selon l'invention, en particulier la présence de SEQ ID N° 1.

On peut détecter la présence d'un acide nucléique selon l'invention dans un échantillon biologique ou alimentaire, ou dans le génome d'un oiseau, par 5 différentes manières. En particulier, on peut définir un procédé de détection et/ou de dosage d'un acide nucléique selon l'invention dans un échantillon biologique, alimentaire caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact dudit échantillon avec un polynucléotide selon l'une des revendications 1 à 3, marqué ;
- 10 b) détection et/ou dosage de l'hybride formé entre ledit polynucléotide et l'acide nucléique dudit échantillon.

On peut également procéder à la détection et/ou au dosage d'un acide nucléique selon l'invention dans un échantillon biologique ou alimentaire, en effectuant une étape d'amplification des acides nucléiques dudit échantillon à l'aide 15 d'amorces choisies parmi les acides nucléiques selon l'invention.

Ainsi qu'il est démontré dans les exemples, l'acide nucléique selon l'invention ne sont exprimés dans les cellules ES d'oiseau que lorsque celles-ci possèdent un caractère pluripotent. Par ailleurs, les cellules ES modifiées selon l'invention, avec un gène rapporteur exprimé spécifiquement lorsqu'elles sont 20 pluripotente, et en particulier les cellules 9N2.5, peuvent être utilisés pour cribler des composés d'intérêt.

En particulier, elles peuvent être utilisées dans un procédé de criblage d'une substance ou d'un milieu capables d'induire une différenciation de cellules pluripotentes, caractérisé en ce que qu'il comprend les étapes suivantes :

- 25 a) maintien de cellules ES selon l'invention dans un milieu de culture permettant le maintien du phénotype pluripotent ;
- b) ajout de ladite substance dans ledit milieu de culture ou remplacement dudit milieu de culture par le milieu à tester ;
- c) détermination de l'induction de la différenciation par l'absence 30 d'expression de la protéine SEQ ID N° 2 ou du gène exogène.

Ce procédé est de préférence mis en œuvre avec des cellules ES modifiées par insertion d'un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur du gène *ens-1*, et

l'on détecte l'absence d'expression dudit gène rapporteur. On utilise de préférence les cellules 9N2.5, et l'on détecte l'absence d'expression de la β -galactosidase.

On peut également utiliser les cellules selon l'invention pour cribler des substances capable de restaurer le caractère pluripotent de cellules différenciées, par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) maintien de cellules différenciées dans un milieu de culture adéquat ;
- b) remplacement dudit milieu de culture par un milieu permettant de maintenir un phénotype pluripotent, et contenant ladite substance à tester ;
- c) détermination de la restauration du caractère pluripotent desdites cellules par l'expression de la protéine SEQ ID N° 2 ou du gène exogène, dans lesdites cellules.

Ce procédé est de nouveau avantageusement mise en œuvre avec des cellules différenciées selon l'invention, modifiées par insertion d'un gène rapporteur dans le gène *ens-1* ou sous contrôle de son promoteur. On utilise avantageusement des cellules 9N2.5 différenciées, qui permettent la détection de l'expression de la β -galactosidase.

Les procédés décrits ci-dessus sont également objets de l'invention, ainsi que les milieux ou substances obtenus par lesdits procédés.

Une telle substance selon l'invention peut être un composé ayant une structure chimique (du type petite molécule organique), un lipide, un sucre, une protéine, un peptide, un composé hybride protéine-lipide, protéine-sucre, peptide-lipide, ou peptide-sucre, une protéine ou un peptide sur lequel on a ajouté des ramifications chimiques.

Parmi les composés chimiques envisagés, ils peuvent contenir un ou plusieurs cycles, aromatique(s) ou non, ainsi que plusieurs résidus de toute sorte (notamment alkyle inférieur, c'est-à-dire présentant entre 1 à 6 atomes de carbones).

Il est extrêmement important de déterminer les gènes impliqués dans le caractère de pluripotence des cellules ES, ou de bénéficier d'un marqueur dudit caractère. En effet, du fait de la capacité pour ces cellules de participer à la morphogenèse de tous les tissus, une modification génétique de celles-ci permet d'assurer que le caractère recherché se retrouvera dans tous les tissus de l'animal

formé. Par ailleurs, l'introduction de gènes exogènes au locus du gène *ens-1*, sous le contrôle de promoteurs à spécificité spatio-temporelle variables peut permettre l'obtention d'animaux transgéniques exprimant lesdits gènes dans des tissus ou à des stades de développement donnés. En effet, la spécificité du gène *ens-1* étant
5 qu'il ne s'exprime que si la cellule hôte possède le caractère pluripotent, l'introduction d'un acide nucléique exogène dans ce locus ne devrait pas gêner le développement de l'embryon.

On peut donc introduire des gènes d'intérêt thérapeutique, par exemple codant pour des protéines thérapeutiques (hormones, facteurs de croissance, lymphokines), afin de pouvoir produire ces protéines lors du développement de
10 l'embryon. Il peut en effet être très intéressant de produire des protéines thérapeutiques dans les œufs, dont la coquille assure un environnement stérile.

On peut également utiliser des cellules pluripotentes selon l'invention afin de les faire coloniser le tissu germinatif d'animaux, en particulier d'oiseaux, de façon plus préférée de l'ordre des Galliformes, afin que des caractères génétiques
15 particuliers puissent être transmis à leur descendance. Ceci permet l'amélioration de races industrielles de poulets, dindes, cailles ou autres d'une façon particulièrement intéressante économiquement.

On peut aussi utiliser les composés choisis parmi

- 20 a) un acide nucléique selon l'invention ;
b) un polypeptide selon l'invention ;
c) un vecteur selon l'invention ;
d) une cellule selon l'invention ;
e) un anticorps selon l'invention ;
25 f) une substance selon l'invention,

à titre de médicament, afin de permettre, selon le cas, la restauration du caractère pluripotent de cellules d'oiseaux, ou au contraire d'induire la différenciation de cellules ES.

La présente invention ouvre donc la voie à une meilleure caractérisation du
30 caractère pluripotent des cellules ES, en fournissant la séquence d'un marqueur de ces cellules. Il reste toutefois à déterminer si ce gène est un facteur essentiel de ce caractère. Ainsi, l'introduction du gène *ens-1* dans des cellules différenciées, par exemple sur un plasmide sous le contrôle d'un promoteur adapté, et l'étude de la

restauration éventuelle du caractère pluripotent de ces cellules permettra de répondre à cette question. Parmi les promoteurs adaptés, on choisira un promoteur inductible, par exemple à un sucre, et l'on déterminera le caractère pluripotent des cellules lorsque l'on cesse d'induire l'expression du gène sur le plasmide. On peut également construire un plasmide qui mène à une excision du gène *ens-1* après un certain temps (par exemple en le plaçant entre deux séquences loxP, et en introduisant un second plasmide codant pour la recombinaise Cre). Pour déterminer le caractère pluripotent des cellules, il peut être avantageux d'utiliser les cellules 9N2.5 selon l'invention, et de rechercher l'expression de la β -galactosidase après introduction du plasmide codant pour *ens-1*.

S'il est possible de déterminer que le gène *ens-1* est inducteur du caractère pluripotent des cellules, on peut mettre en œuvre un procédé de restauration dudit caractère (également objet de l'invention), caractérisé en ce que l'on exprime le gène *ens-1* dans des cellules différenciées. On peut utiliser les méthodes décrites ci-dessus, en y apportant certaines améliorations connues de l'homme du métier.

Les exemples ci-dessous permettent d'illustrer l'invention, et ne doivent pas être considérés comme limitant l'invention.

DESCRIPTION DES FIGURES

- Figure 1 : structure du vecteur ROSA- β -geo utilisé pour transformer les cellules ES.
- 20 Figure 2 : analyse de l'expression du transcrit ROSA- β -geo par RT-PCR dans les cellules 9N2.5 lors de l'induction de la différenciation par l'acide rétinoïque (+RA), le DMSO (+DMSO) ou les deux simultanément (+RA+DMSO). Le milieu contrôle ne contient aucun facteur inducteur.
- Figure 3 : analyse de l'expression du transcrit ROSA- β -geo par Northern Blot lors de l'induction de la différenciation par l'acide rétinoïque. Le Blot est hybridé avec une sonde LacZ.
- Figure 4 : analyse de l'expression du transgène ROSA- β -geo par révélation de l'activité β -galactosidase dans des embryons chimères pour les cellules 9N2.5.
- Figure 5 : analyse par PCR de la présence du transgène ROSA- β -geo dans les 30 embryons chimères. De l'ADN a été extrait, soit de cellules 9N2.5, soit d'embryon chimère âgé de 48 heures ou de 4 jours, résultant de la transplantation de cellules 9N2.5, soit d'embryon contrôle de 48 heures ou 4 jours.

Figure 6 : détection par Southern Blot de la présence du transgène ROSA- β -geo dans l'ADN génomique des cellules 9N2.5 après digestion par *EcoRI* (E) ou *DraI* (D).

5 Figure 7 : détection par Northern Blot de la présence d'un transcrite comportant le transgène ROSA- β -geo, par hybridation avec une sonde Lac Z.

Figure 8 : A. analyse par Northern Blot de l'expression du gène *ens-1* dans des cellules ES normales de poulet et dans les cellules 9N2.5, après hybridation par les sondes C1, S1 et S2. B. structure de l'ADN complémentaire du gène *ens-1*. (RS = séquences répétées, ORF = cadre de lecture). Les flèches représentent les sondes
10 C1, S1 et S2 utilisées pour l'hybridation.

Figure 9 : analyse par Northern Blot de l'expression des transcrits *ens-1* dans les cellules souches embryonnaires normales de poulet, dans les cellules 9N2.5, dans l'embryon de poulet à différents stades de développement et dans différents organes de poussin. Les ARN polyA+ isolés à partir des ARN totaux ont été hybridés sur les
15 blots avec les sondes C1 ou S1, ou avec une sonde contrôle GAPDH.

Figure 10 : analyse de l'expression du transcrite *ens-1* dans l'embryon de poulet par hybridation *in situ*.

Figure 11 : Amplification par PCR réalisé sur l'ADN génomique de différentes espèces aviaires avec les amorces *ens1 S1* (SEQ ID N° 14) et *ens1 AS1* (SEQ ID
20 N° 15).

Figure 12 : schéma de l'organisation des LTR de rétrovirus, de l'organisation attendue pour le gène *ens-1*, ainsi que des deux constructions utilisées pour l'identification du promoteur.

Figure 13 : Activité des promoteurs dans différentes lignées cellulaires (S : promoteur sens, AS : promoteur antisens)
25

Figure 14 : activité du promoteur 2 (figure 12) au cours de la différenciation des cellules ES.

EXEMPLES

30 Exemple 1 : Construction d'une cellule ES de poulet renfermant un marqueur génétique de la pluripotence.

Afin d'identifier un gène spécifiquement exprimé dans les cellules ES pluripotentes la stratégie dite de « piégeage de gène » (*gene trap*) a été suivie. Cette

stratégie consiste à introduire, dans le génome des cellules ES, un gène marqueur qui comporte une séquence codante exogène mais qui est dépourvu de promoteur propre. L'insertion aléatoire de ce marqueur dans le génome de la cellule conduira dans certains cas à placer ce gène exogène en aval d'un promoteur propre du génome cellulaire. Le gène exogène adopte, dans cette configuration, une régulation d'expression très similaire sinon identique à celle du gène dans lequel il est inséré. Le suivi de l'expression du gène marqueur dans les cellules ainsi modifiées renseigne alors sur le patron d'expression du gène cellulaire ainsi « marqué ».

Comme système de piégeage de gène les inventeurs ont utilisé celui qui exploite les propriétés du vecteur ROSA- β -geo décrit par Friedrich et Soriano (1991). Ce système est constitué d'un plasmide qui porte les deux gènes respectivement LacZ et Neo^R fusionnés l'un à l'autre dans l'ordre 5'-3'. Ce gène fusion code pour une protéine unique LacZ-Neo qui confère aux cellules qui la produisent à la fois la résistance au G418 et l'activité β -galactosidase. La structure du plasmide est présentée sur la figure 1. Ce plasmide a été coupé par l'enzyme *DraI* qui induit sa linéarisation. Le plasmide linéarisé a été introduit dans des cellules ES de poulet par la technique d'électroporation. Pour cela une culture de cellules ES de poulet entretenue dans les conditions décrites dans Pain et col. (1996) a été utilisée. Les cellules ES furent recueillies à partir de boîtes de culture par traitement ménagé à la pronase. Les cellules en suspension ont été lavées et mises en suspension dans du milieu de Glasgow à la concentration de 5×10^6 dans 0,8 ml. Dix microgrammes de plasmide linéarisé ont été ajoutés à la suspension cellulaire qui a été maintenue pendant 10 minutes à 4°C. Ensuite la suspension a été soumise à un traitement d'électroporation consistant en 2 stimulations électriques dans les conditions suivantes: 280 V, 500 mF dans une cuve de 1 mm d'épaisseur dans un appareil *BioRad electroporator*. Les cellules ont ensuite été maintenues pendant 10 minutes à 4°C avant d'êtreensemencées en culture selon le procédé décrit dans Pain et col. (1996), incorporé par référence. Trente six heures plus tard les cultures ont été additionnées de G418 à la concentration de 250 μ g/ml. Le milieu de culture contenant le G418 a ensuite été changé tous les jours pendant 4 jours, puis tous les deux jours. Des clones de cellules ES résistantes au G418 sont devenus apparents après le sixième jour. Ils furent prélevés individuellement entre 8 et 10 jours après le début de la culture. Ces clones furentensemencés individuellement dans du

milieu de culture frais contenant du G418 afin d'être amplifiés. Ils furent ensuite conservés dans de l'azote liquide.

Dans les cellules électroporées, l'expression du marqueur ROSA- β -geo a été analysée par l'identification *in situ* de l'activité β -galactosidase selon le procédé suivant. Les cellules en suspension furent fixées à 4°C pendant une durée de 30 minutes dans un mélange à base de PBS contenant 1 % de formaldéhyde, 0,2 % de glutaraldéhyde et 0,02 % de Nonidet P-40. Les cellules furent ensuite incubées à 37°C pendant une durée qui pouvait aller de 1 à 24 heures dans du PBS contenant 1mg/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopuranoside, 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM de $K_4Fe(CN)_6$, 2 mM de $MgCl_2$ et 0,02 % de Nonidet P-40. Les cellules exprimant le marqueur β -galactosidase étaient colorées en bleu.

L'objectif était d'identifier des cellules ES dans lesquelles le vecteur ROSA- β -geo serait inséré en aval d'un promoteur qui ne fonctionnerait que dans les cellules ES lorsque celles-ci sont pluripotentes. Après caractérisation de plusieurs clones, un clone a été retenu, appelé 9N2.5, qui ne présentait la réaction positive du test β -galactosidase que lorsque les cellules étaient maintenues dans les conditions de culture assurant la persistance du caractère pluripotent des cellules telles que décrites dans Pain et col. (1996). La positivité du test fut perdue lorsque les cellules 9N2.5 furent induites dans la différenciation (voir plus loin).

Le clone 9N2.5 a été amplifié en culture *in vitro* puis stocké sous forme viable par congélation dans l'azote liquide.

Exemple 2 : Caractérisation des cellules 9N2.5.

Les cellules 9N2.5 ont été maintenues dans les conditions de culture décrites par Pain et col. (1996), pour les cellules ES de poulet. Dans ces conditions il a été vérifié que les cellules 9N2.5 présentaient la morphologie, l'activité télomérase et les épitopes antigéniques caractéristiques des cellules ES de poulet tels que décrits par Pain et col. Ces cellules sont également capables de former des corps embryoides, comme les cellules parentales. L'électroporation, la sélection dans le G418 et l'amplification ultérieure de ces cellules n'avaient donc pas altéré leurs caractères de cellules ES.

Pour analyser l'expression du marqueur ROSA- β -geo dans les cellules différenciées, les cellules 9N2.5 furent induites dans la différenciation selon les procédés décrits dans Pain et al. Ces cellules furent cultivées en absence de cellules nourricières, en absence de LIF et de cytokines et en présence soit d'acide rétinolique à la concentration de 5×10^{-6} M, soit de DMSO à la concentration de 1 %. Dans certaines cultures, l'acide rétinolique et le DMSO furent ajoutés simultanément. Dans les milieux induisant la différenciation des cellules ES on a pu observer l'apparition de cellules différenciées identiques à celles qui furent décrites initialement par Pain et col. (1996) dans les mêmes conditions.

10 Après 4 jours de culture dans les milieux de différenciation, les cellules devinrent complètement négatives pour le test de l'activité β -galactosidase. Afin de confirmer l'absence d'expression du transgène ROSA- β -geo, son expression fut suivie soit par la recherche des ARNm LacZ par la technique de RT-PCR. Pour cela, les amorces SEQ ID N° 3 et SEQ ID N° 4 furent utilisées :

15 Comme il est montré sur la figure 2, la quantité d'ARN produite par le transgène ROSA- β -geo ne change pas durant 5 jours de culture des cellules dans le milieu de culture qui maintient la pluripotence (milieu ES). Par contre dans les milieux de culture de différenciation contenant soit l'acide rétinolique seul, soit le DMSO, soit l'acide rétinolique et le DMSO, la quantité d'ARNm ROSA- β -geo
20 diminua très fortement après 4 jours de culture. Pour confirmation, les ARNm ROSA- β -geo furent aussi analysés par la technique de *Northern blot* en utilisant une sonde marquée spécifique de la séquence LacZ. Comme cela est montré dans la figure 3, en présence d'acide rétinolique, les ARNm LacZ devinrent quasiment indétectables après deux jours de culture alors que leur expression était maintenue
25 dans le milieu de culture dépourvu d'acide rétinolique.

Conclusion

Les cellules 9N2.5 expriment sélectivement le transgène ROSA- β -geo lorsqu'elles sont maintenues à l'état pluripotent. L'expression du transgène cesse très rapidement après l'induction de la différenciation de ces cellules en culture.

30

Exemple 3 : Test de l'expression du transgène ROSA- β -geo dans les cellules 9N2.5 *in vivo*.

Afin d'analyser les potentialités de développement des cellules 9N2.5 et l'expression du transgène ROSA- β -geo dans un embryon *in vivo*, les cellules 9N2.5 ont été greffées dans des embryons de poulet au stade X selon l'échelle de Eyal-Giladi et Kochav (1976) (échelle E-G&K) selon le protocole décrit par Pain et col. (1996). La présence des descendants des cellules injectées a été recherchée dans les embryons à différents stades de développement après la greffe, par le test de la β -galactosidase. Comme cela est illustré sur la figure 4, des amas de cellules positives pour la β -galactosidase furent détectés dans l'épiblaste des embryons ayant atteint le stade XIII dans les embryons injectés. Ces cellules positives ne furent identifiées que dans l'épiblaste de l'aire pellucide. Plus tard au cours du développement, au stade de la gastrulation, stade 5 selon l'échelle de Hamburger et Hamilton (H&H), des cellules positives ne furent retrouvées que dans la ligne primitive et le croissant germinal extra-embryonnaire. Dans la ligne primitive, les cellules furent identifiées dans quelques amas pour la plupart localisés dans le nœud de Hensen. Au stade 13 (échelle H&H), des cellules positives ne furent trouvées que dans le sinus rhomboïdal qui correspond à la plaque neurale encore ouverte dans la partie caudale de l'embryon. Plus tard au cours du développement embryonnaire, des cellules positives n'ont été retrouvées que sous forme de très rares cellules isolées dans certains tissus d'origine nerveuse, ainsi que dans les ébauches gonadiques.

Afin de vérifier si, malgré la négativité de la réaction β -galactosidase, des descendants des cellules 9N2.5 avaient bien colonisé en nombre les tissus d'embryons âgés, la présence du transgène ROSA- β -geo a été recherchée par PCR dans de l'ADN extrait à partir d'embryon complet âgé de 2 ou 4 jours de développement. Comme cela est montré sur la figure 5, une bande caractéristique du transgène ROSA- β -geo a pu être détectée, démontrant que les cellules descendantes des cellules 9N2.5 greffées étaient présentes au moins 4 jours après la greffe.

Quelques embryons injectés avec des cellules 9N2.5 ont achevé leur développement et ont donné naissance à des poussins. La recherche des séquences du transgène ROSA- β -geo a été entreprise sur l'ADN isolé de divers tissus par la

technique de PCR. Ainsi chez deux poussins qui ont été analysés on a révélé la présence du transgène dans la peau, le gésier, le foie. Tous ces tissus ne présentaient pas d'activité β -galactosidase ce qui démontre que les transgènes étaient présents dans des cellules différenciées issues des cellules 9N2.5 greffées.

5 Conclusion

Les cellules 9N2.5 sont donc capables de coloniser un embryon hôte et de s'y développer. Cependant l'expression du transgène ROSA- β -geo reste limitée aux cellules très tôt après la transplantation dans l'embryon ainsi qu'à de rares cellules présentent dans quelques tissus comme les gonades ou le système nerveux. Compte tenu des observations effectuées sur les cellules 9N2.5 en culture, on peut raisonnablement imaginer que l'expression du transgène ROSA- β -geo dans les

10 cellules *in vivo* se limite aux cellules qui ne se sont pas encore engagées dans la différenciation.

L'ensemble de ces données obtenues *in vitro* et *in vivo* à partir des cellules

15 9N2.5 conduit à supposer que le transgène ROSA- β -geo est inséré dans un locus du génome de ces cellules dont l'activité transcriptionnelle est spécifique des cellules ES à l'état pluripotent.

Exemple 4 : Prolifération des cellules 9N2-5 *in vivo*.

20 Afin d'analyser si les cellules 9N2.5 étaient capables de proliférer dans certains compartiments de l'embryon, deux embryons injectés ont été prélevés après 7 jours d'incubation. Les embryons ont été arbitrairement coupés en 3 parties : la tête, le tronc en incluant les ébauches des membres supérieurs, la queue en incluant les ébauches des membres inférieurs. Ces parties ont été dissociées dans la pronase

25 et la suspension cellulaireensemencée en culture selon le procédé de culture décrit par Pain et col. (1996). Une sélection au G418 à 250 μ g/ml fut réalisée pendant 6 jours. Il apparut quelques foyers de cellules résistantes dans toutes les cultures, mais la fréquence de ces foyers étaient beaucoup plus élevée dans les cultures ensemencées à partir de la partie postérieure des embryons. Les cellules résistantes

30 au G418, issues de cette culture furent repiquées pour être amplifiées, 7 jours après l'ensemencement initial. Une partie de ces cultures parallèles fut testée positivement pour l'expression de l'activité β -galactosidase. Cette approche a

permis, pour un des 2 embryons testés, de maintenir, d'amplifier et même de congeler, sous forme viable, des cellules positives pour la β -galactosidase, résistantes au G418 et qui présentaient une morphologie identique à celle des cellules 9N2.5 injectées. Les cellules issues du deuxième embryon, bien que
5 positives pour l'activité β -galactosidase, n'ont proliféré que lentement et n'ont pas pu être suffisamment amplifiées.

Conclusion

Ces résultats montrent donc que certaines cellules 9N2.5 sont capables de se maintenir sous forme de cellules ES dans certaines régions de l'embryon. Ces
10 cellules correspondent vraisemblablement aux rares cellules positives pour la β -galactosidase identifiées sur les coupes d'embryons injectés avec les cellules 9N2.5 (voir ci-dessus). Au regard de leur localisation dans la partie postérieure de l'embryon, on peut suggérer que certaines des cellules qui conservent les caractères des cellules 9N2.5 *in vivo* correspondent à des cellules EG telles que décrites chez
15 la souris et chez l'homme (Matsui et al. 1992, Shambloft et al. 1998). Les cellules EG sont des cellules précurseurs des cellules germinales qui possèdent des propriétés de pluripotence et des caractères cytologiques très voisins de ceux des cellules ES.

20 Exemple 5 : Utilisation des cellules 9N2.5 pour un criblage de substances

Les cellules 9N2.5 présentent une expression de la β -galactosidase forte quand elles sont dans un état indifférencié. Cette expression est perdue lors d'une induction de différenciation. Cette propriété peut être mise à profit pour tester
25 différentes molécules inductrices ou promotrices de la différenciation ou pour tester des molécules non inductrices. Les cellules 9N2.5 peuvent ainsi être utilisées comme support de test pour identifier des lots de sérum appropriés à la culture de cellules ES ou bien à leur différenciation. Pour cela, les cellules sontensemencées dans un milieu identique à celui employé pour maintenir les cellules parentales. Dans ce milieu, le sérum de référence est remplacé par les différents sera à tester, à
30 différentes concentrations éventuellement. Les ensemencements sont réalisés à très faible densité (2×10^4 cellules par boîte de 35 mm) et les cellules cultivées pendant 4 jours. Les cellules sont alors fixées, colorées pour révéler l'activité β -

galactosidase et le nombre de foyers positifs estimé. Le nombre de foyers positifs est en relation directe avec la capacité du sérum à maintenir l'autorenouvellement des cellules ES. Cet exemple peut être étendu au test de substances diverses, naturelles ou de synthèse.

5 Conclusion

Les cellules 9N2.5 peuvent être utilisées pour cribler des substances sur leur aptitude à induire l'autorenouvellement ou bien la différenciation de cellules ES en culture.

10 Exemple 6 : Identification du locus d'intégration du transgène ROSA- β -geo dans les cellules ES 9N2.5

Dans une première approche vers l'identification du locus d'intégration du transgène ROSA- β -geo dans les cellules 9N2.5 une analyse de l'ADN génomique des cellules 9N2.5 par la technique de *Southern Blot* a été effectuée. L'ADN de
15 cellules 9N2.5 fut digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI* ou par l'enzyme *DraI* qui ne coupent chacune le transgène ROSA- β -geo qu'en un site unique. Après migration électrophorétique de l'ADN digéré, les filtres furent hybridés avec une sonde spécifique du fragment LacZ. Comme cela est montré sur la figure 6, une seule bande a été identifiée dans ces conditions dans chacune des digestions
20 pratiquées. Aucune bande ne fut identifiée dans l'ADN de cellules ES normales de poulet ne contenant pas le transgène ROSA- β -geo. Ces résultats démontraient que, dans les cellules 9N2.5, une seule copie du transgène ROSA- β -geo est intégrée.

Dans un second temps, la taille de l'ARNm transcrit à partir du transgène a été analysé. De l'ARN de cellules 9N2.5 a été analysé par *Northern blot* avec une
25 sonde LacZ. Comme cela est montré sur la figure 7, un seul transcrit de taille 4,7 kb a été révélé. Ce transcrit n'est pas présent dans l'ARN de cellules ES normales. Compte tenu de la longueur attendue de la séquence qui doit être transcrite dans le transgène ROSA- β -geo, soit 3,9 kb, on doit imaginer que le transcrit révélé dans les cellules 9N2.5 contient environ 0,8 kb de séquences issues du gène cellulaire dans
30 lequel est inséré le transgène. Ces séquences cellulaires peuvent se situer sur l'ARNm soit en 5', soit en 3', soit être réparties des deux côtés de la séquence transcrite du transgène ROSA- β -geo. Afin de les rechercher en région 5', la

technique 5'-RACE en utilisant le kit *Marathon* de la société Clontech a été mise en œuvre.

À partir d'ARN de cellules 9N2.5, un brin d'ADN complémentaire fut synthétisé en utilisant une amorce spécifique de la région *LacZ*, amorce de séquence (SEQ ID N° 5).

Après synthèse du second brin complémentaire de ce premier brin, l'ADN complémentaire double brin fut lié à l'adaptateur fourni dans le kit *Marathon* dont la séquence est SEQ ID N° 6. L'ensemble de la séquence fusionnée fut ensuite amplifié par la technique de PCR en utilisant les amorces SEQ ID N° 7 et SEQ ID N° 8.

L'amplification fut réalisée sur une machine *2400 Perkin Elmer* dans les conditions suivantes: 94°C pendant 30 secondes, puis 5 cycles à 94°C de 5 secondes chacun, puis 4 minutes à 72°C, puis 5 cycles à 94°C de 5 secondes chacun, puis 4 minutes à 70°C, puis 25 cycles à 94°C de 5 secondes chacun, puis 4 minutes à 68°C. Un produit d'amplification de 400 paires de bases fut identifié. Ce fragment appelé F1 fut cloné dans un plasmide pour être amplifié, puis sa séquence exacte fut déterminée. Nous avons ensuite recherché des séquences situées en aval de la séquence F1 sur l'ARNm transcrit dans les cellules ES en utilisant la technique de RT-PCR. Pour cela de l'ARN de cellules ES normales fut utilisé comme matrice pour synthétiser un ADN complémentaire par amorçage au moyen d'une amorce P3 de séquence SEQ ID N° 9.

L'ADN complémentaire monocaténaire fut ensuite amplifié par PCR au moyen des amorces SEQ ID N° 10 qui correspond à la séquence 5' du fragment initialement amplifié par la technique 5'-RACE, et SEQ ID N° 11.

Un fragment appelé C1 fut ainsi amplifié puis cloné dans un plasmide. La séquence exacte de C1 fut déterminée (SEQ ID N° 12).

Afin de confirmer que la séquence C1 est bien dans les ARNm qui portent aussi la séquence *LacZ* dans les cellules 9N2.5, une amplification par RT-PCR a été effectuée sur les ARNm issus de ces cellules en utilisant les amorces respectives P4 (SEQ ID N° 13), spécifique du fragment C1, et *LacZB* (SEQ ID N°8), spécifique de la séquence *LacZ*.

Un fragment de 331 paires de bases fut identifié. La taille de ce fragment correspond à celle attendue ce qui indique que la séquence C1 et la séquence *LacZ*

se trouvent bien sur un même ARNm. La confirmation était ainsi apportée que la séquence C1 doit être spécifique du gène cellulaire dans lequel est inséré le transgène ROSA- β -geo. Ce gène a été appelé *ens-1* (embryonic normal stem cell gene).

5 Afin de vérifier que le gène *ens-1* produit bien un ARN messager les ARN de cellules ES normales de poulet ont été analysés par la technique de *Northern blot* au moyen de la sonde C1. Comme cela est montré sur la figure 8.A, la sonde C1 identifie un ARN majeur de taille voisine de 4,7 kb ainsi que deux ARN très faiblement marqués d'environ 10 kb et 2 kb respectivement.

10 À partir de la séquence C1, le clonage de l'ARNm complet transcrit à partir du gène *ens-1* a été entrepris.

Pour cela une banque d'ADNc construite à partir d'ARN polyadénylés isolés de cellules ES de poulet a été criblée avec des sondes préparées à partir du fragment C1.

15 Un ADN complémentaire de 4,2 kpb a été isolé. Afin de vérifier si cet ADNc est bien représentatif de l'ARNm transcrit à partir du gène *ens-1*, deux sondes nucléotidiques ont été préparées, respectivement S1 et S2, correspondant à deux fragments différents de cet ADNc situés en aval de la séquence C1. Ces deux sondes ont été utilisées pour identifier, par la technique de *Northern blot*, les ARN
20 correspondants isolés de cellules ES normales de poulet. Comme cela est montré sur la figure 8.A, ces deux sondes identifient un ARN de taille voisine de 4,5 kb, identique à celle de l'ARN majoritaire identifié précédemment avec la sonde C1. Comme cela est montré plus loin le patron d'expression de cet ARN identifié avec les deux sondes S1 et S2 est identique à celui de l'ARN majoritaire identifié avec
25 sonde C1 dans les cellules ES normales.

L'ensemble de ces données suggère très fortement que les sondes C1, S1 et S2 reconnaissent le même ARNm *ens-1* dans les cellules ES normales de poulet.

La séquence de l'ARNm *ens-1* est présentée dans SEQ ID N° 1, et la structure de l'ADNc est présentée dans la figure 8.B. L'analyse de cette séquence
30 révèle un cadre de lecture de grande longueur pouvant coder pour une protéine de 490 acides aminés dont la séquence est présentée par SEQ ID N° 2. Il est à noter que la séquence C1 est polymorphique et que celle obtenu à partir du clone

d'ADNc, et présentée dans SEQ ID N° 1, est légèrement différente de celle obtenue précédemment par 5'RACE (SEQ ID N° 12).

5 Afin de vérifier si le gène *ens-1* correspond bien au gène dans lequel est inséré le transgène ROSA- β -geo dans les cellules 9N2.5 le patron d'expression du gène *ens-1* au cours du développement embryonnaire du poulet et au cours de la différenciation des cellules ES de poulet en culture a été analysé en utilisant la technique de *Northern blot*.

10 Comme cela est montré dans la figure 9, la sonde C1 et la sonde S1 identifient le même ARN de 4,5 kb dans les ARN extraits d'embryon de poulet normal de 48 heures. L'intensité du signal diminue fortement dans les ARN extraits d'embryons plus âgés, comme les embryons de 3 jours et de 4 jours. Le signal disparaît dans les ARN extraits d'embryons âgés de 7 jours ou de 18 jours. Il est nul dans les ARN extraits de divers tissus de poussin comme le foie, le muscle, le

15 gésier, le cerveau, le cœur, l'œil, l'os ou la peau.

Afin de déterminer plus précisément le patron d'expression du gène *ens-1* durant les premiers stades du développement de l'embryon de poulet, les ARNm *ens-1* ont été recherchés par la technique d'hybridation *in situ* sur embryon total. Les résultats sont présentés sur la figure 10. Un signal très fort fut observé dans l'aire pellucide d'embryon aux stade X et XIII (échelle E-G&K). Dans les 20 embryons au stade 2 (échelle H&H), le signal ne fut trouvé que dans l'aire pellucide avec une forte dominance dans la région de la ligne primitive. Au stade 5 (échelle H&H) le signal fut retrouvé dans le nœud de Hensen et dans la région rostro-caudale de la ligne primitive, ainsi que sous une forme très prononcée dans le croissant germinale en position antérieure de l'embryon. À des stades plus avancés 25 du développement embryonnaire, aucun signal significatif ne fut détecté. Les mêmes patrons d'expression furent observés avec les sondes C1 et S1.

Conclusion

Le gène *ens-1* présente une expression spécifique des cellules ES de poulet 30 indifférenciées et des stades très précoces de l'embryogenèse. L'expression du gène devient très faible voire indétectable après l'achèvement de la gastrulation.

Le gène *ens-1* constitue donc un marqueur très spécifique des cellules embryonnaires indifférenciées, que ces cellules soient présentes dans l'embryon, ou qu'elles soient maintenues dans cet état en culture *in vitro*. Le gène *ens-1* est aussi

spécifique des cellules du croissant germinal et donc des cellules précurseurs des gamètes.

Exemple 7 : Conservation du gène *ens-1* au cours de l'évolution

5 Afin d'analyser le degré de conservation du gène *ens-1* au cours de l'évolution une sonde spécifique du gène *ens-1* de poulet a été utilisée pour hybrider de l'ADN génomique provenant de diverses espèces animales par la technique du southern blot (non montré). La technique d'amplification de séquence nucléique par PCR entre deux amorces spécifiques du gène *ens-1* (SEQ ID N° 14 et SEQ ID N°
10 15), en utilisant le protocole : 96°C 3 minutes, (96°C 30 s, 62°C 30s, 72°C 30s, 10 cycles), (96°C 30s, 57°C 30s, 72°C 30s, 10 cycles), (96°C 30s, 52°C 30s, 72°C 30s, 20 cycles), a également été utilisée. Les résultats présentés sur la figure 11 montrent que des séquences homologues sont retrouvées uniquement dans l'ordre des galliformes (poulet, caille, dinde, faisán, perdrix rouge, perdrix grise). Il est à noter
15 qu'aucune homologue à *ens-1* n'est trouvé chez les mammifères (non montré).

Exemple 8 : Identification dans le gène *ens-1* d'une séquence promoteur de transcription dont l'activité est spécifique des cellules souches embryonnaires.

20 Le gène *ens-1* a donc été identifié comme étant un gène spécifiquement exprimé dans les cellules souches embryonnaires de poulet.

Une région promoteur dont l'activité transcriptionnelle est spécifique des cellules ES indifférenciées de poulet a été identifiée dans le gène *ens-1*. Les applications sont importantes car cela permet de disposer ainsi d'un outil génétique qui permettrait de cibler l'expression d'un transgène spécifiquement dans les cellules
25 souches embryonnaires et vraisemblablement aussi dans les embryons de poulet au stade précédent la gastrulation.

La présence de séquences répétées aux extrémités du transcrit *ens-1* suggérerait que ces séquences soient apparentées aux séquences LTR (long terminal
30 repeat) des rétrovirus. Les LTR de rétrovirus sont régionalisées en trois parties, respectivement, U3, R et U5 (dans le sens 5'-3'). Dans le génome rétroviral, la région U3 est capable d'activer la transcription avec parfois un contrôle

tissu-spécifique. Dans les ARN messagers rétroviraux, une copie des séquences R-U5 se trouve en 5' et une copie des séquences U3-R se trouve en 3'.

Par analogie avec la structure des LTR de rétrovirus, les régions pouvant correspondre aux régions U3, R et US des rétrovirus ont été identifiées dans l'ARN
5 messager du gène *ens-1*. La séquence identifiée comme étant répétée aux deux extrémités du transcrit *ens-1* correspond à la région R et la séquence qui correspondrait à la région U3 se localise entre l'extrémité 3' de la séquence codante pour *ens-1* et l'extrémité 5' de R. (fig 12).

10 Pour tester l'activité promotrice des régions R et U3-R du gène *ens-1*, ces régions ont été clonées dans les deux orientations possibles, sens et antisens, en amont du gène rapporteur de la luciférase de luciole pour obtenir respectivement les vecteurs appelés promoteur 1 et promoteur 2, respectivement sens (S) et anti-sens (AS). (Fig 12). Ces constructions ont été transfectées dans différentes lignées
15 cellulaires, dont des cellules souches de poulet 9N2-5, avec pour contrôle interne d'efficacité de transfection, le vecteur pRL-CMV (Promega) contenant le gène de luciférase de la chenille Renilla sous le contrôle du promoteur du cytomegalovirus.

La transfection des divers vecteurs promoteur 1 et promoteur 2 dans les
20 cellules 9N2-5 et la mesure de l'activité luciférase normalisée grâce au contrôle interne ont permis d'identifier une activité transcriptionnelle de la région U3 du vecteur promoteur 2S dans les cellules souches embryonnaires de poulet (cellules 9N2-5) alors que la région R ne montre aucune activité significative (Fig 13). L'activité du promoteur est par contre très faible dans les différentes autres lignées
25 cellulaires testées (fibroblastes de caille Q6, cellules épithéliales de caille QBr ou cellules épithéliales humaines). D'autre part le vecteur promoteur 2S a été transfecté dans des cellules souches embryonnaires 9N2-5 induites à se différencier par traitement à l'acide rétinolique. La mesure de l'activité luciférase dans les cellules à différents temps après le traitement par l'acide rétinolique montre que l'activité
30 transcriptionnelle du promoteur décroît au cours de la différenciation des cellules souches embryonnaires alors que l'activité du promoteur contrôle (CMV) reste forte. (Fig 14).

L'ensemble de ces résultats montre qu'il existe, en 3' de la séquence codante du gène *ens1*, une région dotée d'une activité promotrice de la transcription et que cette activité transcriptionnelle est spécifique des cellules souches embryonnaires de poulet indifférenciées.

5

En utilisant la technique 5' RACE sur le vecteur promoteur 2S il a été possible de déterminer un site initiateur de transcription sur la séquence de l'ADNc *ens-1* (SEQ ID N° 1), ainsi qu'une séquence de type promoteur TATA en amont de ce site initiateur de transcription. Le promoteur correspond aux nucléotides 3111-10 3670 de SEQ ID N° 1.

DEPOT DE MATERIEL BIOLOGIQUE

La lignée cellulaire 9N2.5 a été déposée le 11 Mai 2000 à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 25 rue du Docteur Roux, 15 75724 Paris Cedex 15, France, selon les dispositions du Traité de Budapest, sous le numéro d'ordre I-2477, et correspond à la lignée de cellules souches embryonnaires de poulet dans laquelle le transgène ROSA- β -geo linéarisé par *DraI* a été introduit par électroporation, et qui ont été isolées après sélection au G418, et pour leur activité β -galactosidase, ainsi que décrit dans l'exemple 1.

20

Les cellules utilisables pour cultiver les cellules 9N2.5 (fibroblastes de souris, STO) ont également été déposées à la CNCM le 11 Mai 2000, sous le numéro SH-2477.

Références

- 25 Buckholz, (1993), Curr. Op. Biotechnology 4, 538.
Carter, (1993) Curr. Op. Biotechnology 3, 533.
Duck et al. (1990), Biotechniques, 9, 142.
Edwards et Aruffo (1993), Curr. Op. Biotechnology, 4, 558.
Epstein (1992) Médecine/Sciences, 8, 902.
30 Etches et al. (1996). Science 76, 1075-1083.
Eyal-Giladi et Kovak (1976). Dev. Biol. 151, 575-585.
Freidrich et Soriano (1991). Genes & Development 5, 1513-1523.
Guatelli et al. (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874.

- Kemler et al. (1981). *J. Embryol. Exp. Morph.* 64, 45-60.
- Kievitis et al. (1991), *J. Virol. Methods*, 35, 273.
- Köhler et Milstein. (1975) *Nature* 256, 495.
- Kwoh, et al. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 1173.
- 5 Landegren et al. (1988) *Science* 241, 1077.
- Luckow (1993), *Curr. Op. Biotechnology* 4, 564.
- Matsui et al. (1992), *Cell* 70, 841-847.
- Mathews et al. (1988), *Anal. Biochem.*, 169, 1-25.
- Miele et al. (1983), *J. Mol. Biol.*, 171, 281.
- 10 Neddleman et Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48 : 443
- Olins et Lee (1993), *Curr. Op. Biotechnology* 4 : 520.
- Pain et al. (1996). *Development* 122, 2339-2348.
- Pain et al. (1999). *Cells Tissues Organs* 165, 212-219.
- Perricaudet et al. (1992). *La Recherche* 23 : 471.
- 15 Pearson et Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 2444
- Prowse et Greider (1995). *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 4818-4822.
- Rohlmann et al. (1996) *Nature Biotech.* 14 : 1562.
- Rolfs, A. et al. (1991), Berlin : Springer-Verlag.
- Rosner et al. (1990). *Nature* 354, 686-692.
- 20 Sambrook et al. (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual.* 2nd Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
- Segev, (1992), Kessler C. Springer Verlag, Berlin, New-York, 197-205.
- Shamblott et al. (1998). *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13726-13731.
- Smith et Waterman (1981) *Ad. App. Math.* 2 : 482
- 25 Solter et Knowles (1978) *Proc Natl Acad Sci USA.* 75, 5565-5569.
- Stewart et Yound (1984), *Solid phase peptides synthesis*, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2^{ème} éd., (1984).
- Strickland et al. (1980). *Cell* 21, 347-355.
- Temin, (1986) *Retrovirus vectors for gene transfer.* In Kucherlapati R., ed. *Gene Transfer*, New York, Plenum Press, 149-187.
- 30 Walker (1992), *Nucleic Acids Res.* 20 : 1691.

Revendications

1. Acide nucléique purifié ou isolé, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléique choisie dans le groupe de séquences suivantes :
 - 5 a) SEQ ID N° 1, ou le fragment correspondant aux nucléotides 1409-2878 de SEQ ID N° 1 ;
 - b) la séquence d'un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs d'une séquence choisie parmi SEQ ID N° 1 en particulier le fragment correspondant aux nucléotides 3111-3670 de SEQ ID N° 1 ;
 - 10 c) une séquence nucléique présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, après alignement optimal avec une séquence définie en a) ou b), ladite séquence n'étant pas définie par les nucléotides 2308-2927 ou 3094-3753 de SEQ ID N° 1 ;
 - 15 d) une séquence nucléique s'hybridant dans des conditions de forte stringence avec une séquence nucléique définie en a) ou b) , ladite séquence n'étant pas définie par les nucléotides 2308-2927 ou 3094-3753 de SEQ ID N° 1 ;
 - 20 e) la séquence complémentaire ou la séquence d'ARN correspondant à une séquence telle que définie en a), b), c) ou d).
2. Acide nucléique purifié ou isolé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend ou est constitué de SEQ ID N° 1, la séquence complémentaire ou la séquence d'ARN correspondant à une de ces séquences.
3. Acide nucléique purifié ou isolé caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide possédant un fragment continu d'au moins 200 acides aminés de la protéine SEQ ID N° 2.
4. Polypeptide isolé caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi :
 - a) un polypeptide correspondant à SEQ ID N° 2 ;
 - b) un polypeptide variant d'un polypeptide de séquence définie en a) ;
 - 30 c) un polypeptide homologue à un polypeptide défini en a) ou b), comportant au moins 80 % d'homologie avec ledit polypeptide de a) ;

- d) un fragment d'au moins 15 acides aminés consécutifs d'un polypeptide défini en a), b) ou c) ;
 - e) un fragment biologiquement actif d'un polypeptide défini en a), b) ou c).
- 5 5. Polypeptide selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il est constitué d'une séquence choisie parmi SEQ ID N° 2, ou une séquence possédant au moins 80 % d'homologie avec cette séquence après alignement optimal.
6. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 ou codant pour un polypeptide selon l'une des revendications 4 et 5.
- 10 7. Cellule hôte caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur selon la revendication 6.
8. Cellule hôte contenant un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule ES d'oiseau modifiée en outre par introduction d'un gène exogène, ledit gène exogène étant uniquement et spécifiquement exprimé lorsque ladite cellule est maintenue à l'état pluripotent.
- 15 9. Cellule selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit gène exogène est un gène rapporteur.
10. Cellule selon la revendication 9, caractérisée en ce que ledit gène rapporteur est choisi parmi lacZ, GFP, luciférase, ROSA- β -geo, un gène de résistance à un antibiotique.
- 20 11. Cellule hôte contenant un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule d'oiseau modifiée en outre par introduction d'un acide nucléique exogène, ledit acide nucléique exogène étant intégré dans ledit acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3.
- 25 12. Cellule selon la revendication 11, caractérisée en ce que ledit acide nucléique exogène est un gène d'intérêt thérapeutique, éventuellement précédé d'un promoteur spatio-temporelle et/ou de séquences terminatrices.
13. Cellule selon la revendication 11, caractérisée en ce que ledit acide nucléique exogène est un marqueur génétique.
- 30 14. Cellule selon l'une des revendications 8 à 13, caractérisée en ce que ledit oiseau appartient à l'ordre des Galliformes.

15. Cellule selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit oiseau est un poulet ou une caille.
16. Cellule selon l'une des revendications 14 et 15, caractérisée en ce que ledit gène rapporteur est intégré sous le contrôle du promoteur du gène *ens-1*.
- 5 17. Cellule selon l'une des revendications 14 et 15, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule 9N2.5, déposée à la Collection Nationale des Microorganismes le 11 Mai 2000 sous le numéro d'ordre I-2477.
18. Cellule d'oiseau différenciée, caractérisée en ce qu'elle dérive d'une cellule ES selon l'une des revendication 8 à 17.
- 10 19. Animal, excepté l'homme, caractérisé en ce qu'il comprend une cellule selon l'une des revendications 7 à 18.
20. Utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 en tant que sonde ou amorce, pour la détection et/ou l'amplification de séquences d'acide nucléique.
- 15 21. Utilisation d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 comme oligonucléotide sens ou antisens.
22. Utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 pour la production d'un polypeptide recombinant.
23. Procédé d'obtention d'un polypeptide recombinant caractérisé en ce que l'on cultive une cellule selon la revendication 7 dans des conditions permettant l'expression dudit polypeptide et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.
- 20 24. Polypeptide recombinant caractérisé en ce qu'il est obtenu par un procédé selon la revendication 23.
- 25 25. Anticorps monoclonal ou polyclonal caractérisé en ce qu'il lie sélectivement un polypeptide selon l'une des revendications 4, 5 ou 24.
26. Procédé de détection d'un polypeptide selon l'une des revendications 4, 5 ou 24, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- 30 a) mise en contact d'un échantillon biologique avec un anticorps selon la revendication 25 ;
- b) mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé.
27. Trousse de réactifs pour la mise en œuvre d'un procédé selon la revendication 26, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- a) un anticorps monoclonal ou polyclonal selon la revendication 25 ;
- b) éventuellement des réactifs pour la constitution d'un milieu propice à la réaction immunologique ;
- 5 c) les réactifs permettant la détection du complexe antigène-anticorps produit lors de la réaction immunologique.
28. Procédé de détermination du caractère pluripotent d'une cellule ES d'oiseau, caractérisé en ce qu'on détermine la présence d'un produit d'expression du gène correspondant à SEQ ID N°1 ou de l'ARNm de SEQ ID N° 1.
- 10 29. Procédé selon la revendication 28, caractérisé en ce que la détection de l'ARNm de SEQ ID N° 1 s'effectue par Northern Blot ou par RT-PCR en utilisant une sonde ou des amorces, par une utilisation selon la revendication 20.
30. Procédé selon la revendication 28, caractérisé en ce que l'on détecte la présence de la protéine SEQ ID N° 2, par exemple en utilisant un anticorps selon la
- 15 revendication 25.
31. Procédé de classification de l'appartenance d'un oiseau à l'ordre des Galliformes, caractérisé en ce que l'on détecte, dans le génome dudit oiseau, la présence d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3.
32. Procédé de détermination de la présence d'un échantillon provenant d'un oiseau de l'ordre des Galliformes dans un échantillon alimentaire, caractérisé en ce que
- 20 l'on détecte, dans ledit échantillon, la présence d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3.
33. Puce à ADN caractérisée en ce qu'elle contient une séquence nucléique selon l'une des revendications 1 à 3.
- 25 34. Puce à protéines caractérisée en ce qu'elle contient un polypeptide selon l'une des revendications 4, 5 ou 24, ou un anticorps selon la revendication 25.
35. Procédé de détection et/ou de dosage d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 dans un échantillon biologique ou alimentaire, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- 30 a) mise en contact dudit échantillon avec un polynucléotide selon l'une des revendications 1 à 3, marqué ;
- b) détection et/ou dosage de l'hybride formé entre ledit polynucléotide et l'acide nucléique dudit échantillon.

36. Procédé de détection et/ou de dosage d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 dans un échantillon biologique ou alimentaire, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'amplification des acides nucléiques dudit échantillon à l'aide d'amorces choisies parmi les acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 2.
- 5
37. Procédé de criblage d'une substance ou d'un milieu capables d'induire une différenciation de cellules pluripotentes, caractérisé en ce que qu'il comprend les étapes suivantes :
- 10
- a) maintien de cellules ES selon l'une des revendications 7 à 17 dans un milieu de culture permettant le maintien du phénotype pluripotent ;
 - b) ajout de ladite substance dans ledit milieu de culture ou remplacement dudit milieu de culture par le milieu à tester ;
 - c) détermination de l'induction de la différenciation par l'absence
- 15
- d'expression de la protéine SEQ ID N° 2 ou du gène exogène.
38. Procédé selon la revendication 37, caractérisé en ce qu'il est effectué avec des cellules selon l'une des revendications 8 à 17.
39. Procédé selon la revendication 37 ou 38, caractérisée en ce que l'on utilise des cellules 9N2.5, et que l'on détecte l'absence d'expression de la β -galactosidase.
- 20
40. Procédé de criblage d'une substance capable de restaurer le caractère pluripotent de cellules différenciées, caractérisé en ce que qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) maintien de cellules différenciées dans un milieu de culture adéquat ;
 - b) remplacement dudit milieu de culture par un milieu permettant de maintenir un phénotype pluripotent, et contenant ladite substance à tester ;
 - c) détermination de la restauration du caractère pluripotent desdites
- 25
- cellules par l'expression de la protéine SEQ ID N° 2 ou du gène exogène, dans lesdites cellules.
- 30
41. Procédé selon la revendication 40, caractérisé en ce qu'il est effectué avec des cellules différenciées dérivant de cellules selon l'une des revendications 8 à 17.

42. Procédé selon la revendication 40 ou 41, caractérisée en ce que l'on utilise des cellules 9N2.5 différenciées, et que l'on détecte l'expression de la β -galactosidase.
43. Milieu ou substance caractérisé en ce qu'il est obtenu par un procédé selon l'une des revendications 37 à 42.
44. Composé caractérisé en ce qu'il est choisi parmi
- a) un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3 ;
 - b) un polypeptide selon l'une des revendications 4, 5 ou 24 ;
 - c) un vecteur selon la revendication 6 ;
 - d) une cellule selon l'une des revendications 7 à 17 ;
 - e) un anticorps selon la revendication 25 ;
 - f) une substance selon la revendication 43,
- à titre de médicament.
45. Utilisation d'un acide nucléique correspondant aux nucléotides 3111-3670 de SEQ ID N° 1 en tant que promoteur d'un gène d'intérêt pour une expression spécifique dudit gène d'intérêt dans des cellules pluripotentes aviaires.

1/15

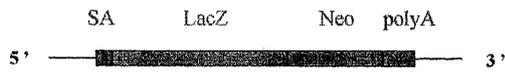


FIG.1

2/15

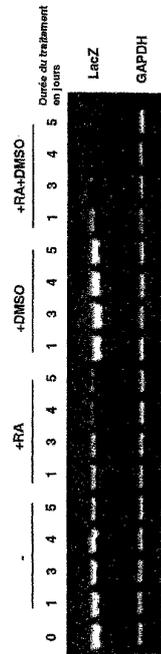


FIG.2

3/15

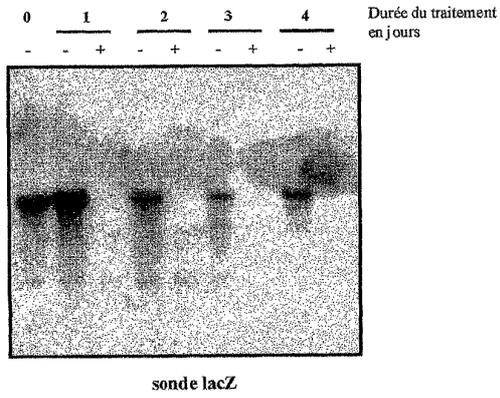
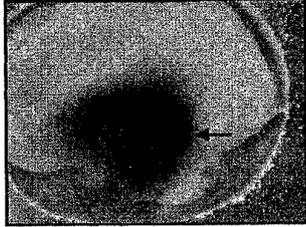


FIG.3

4/15



stage XIII



stage 5



stage 13

FIG.4

5/15

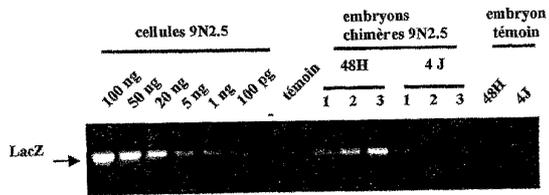


FIG.5

6/15

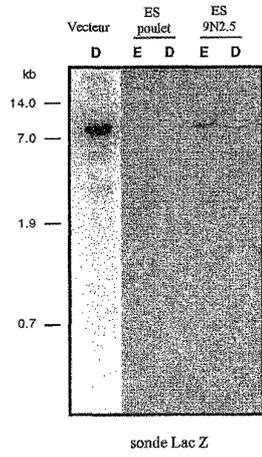
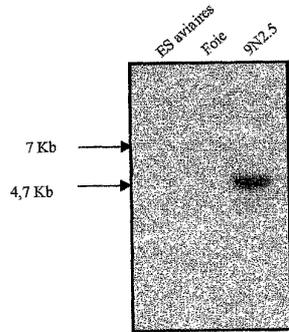


FIG.6

7/15



Hybridation avec une sonde LacZ

FIG.7

WO 01/85938

PCT/FR01/01207

8/15

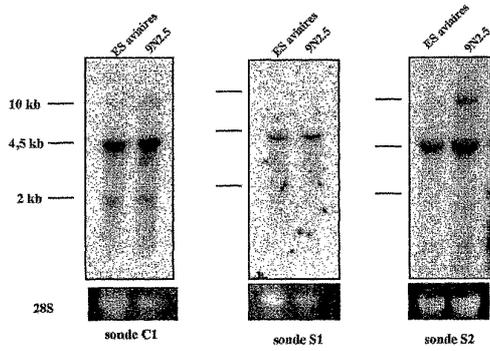


FIG.8A

9/15

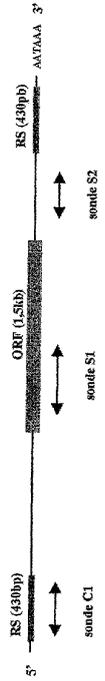


FIG.8B

11/15

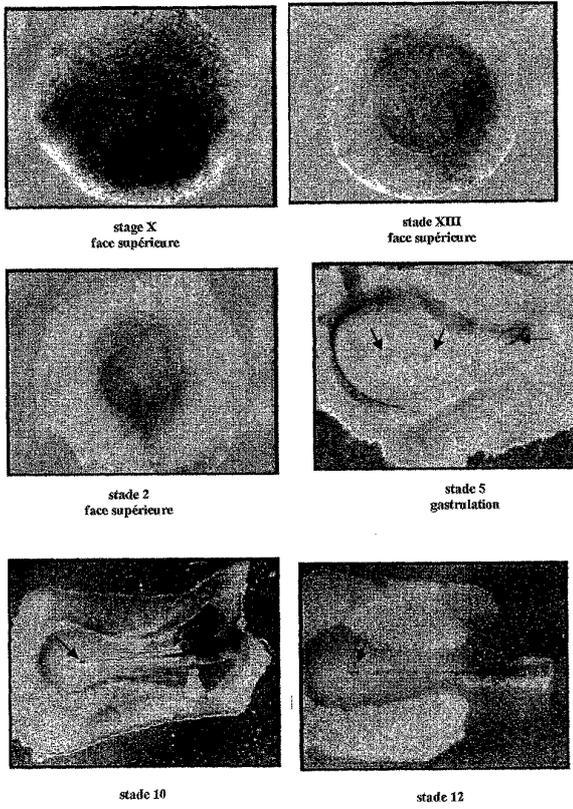


FIG.10

12/15

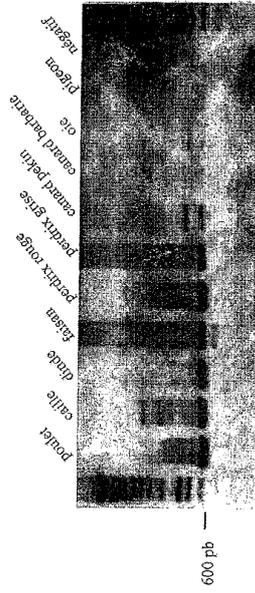


FIG.11

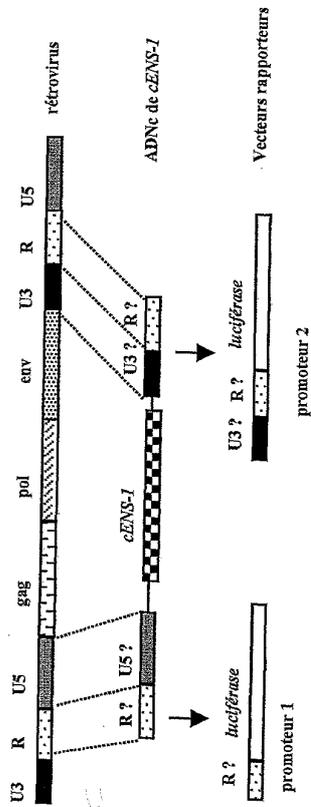


FIG.12

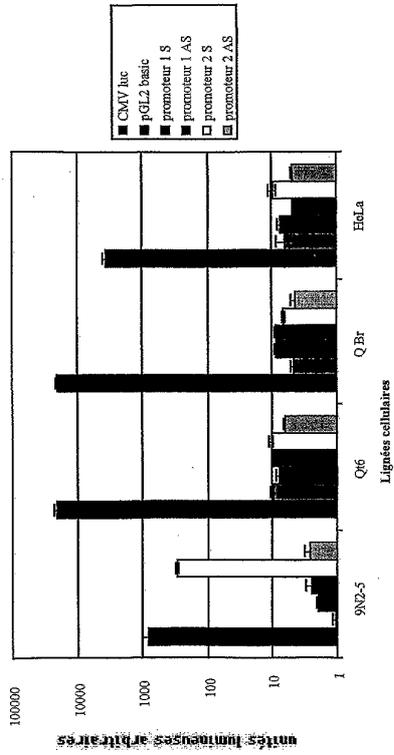


FIG.13

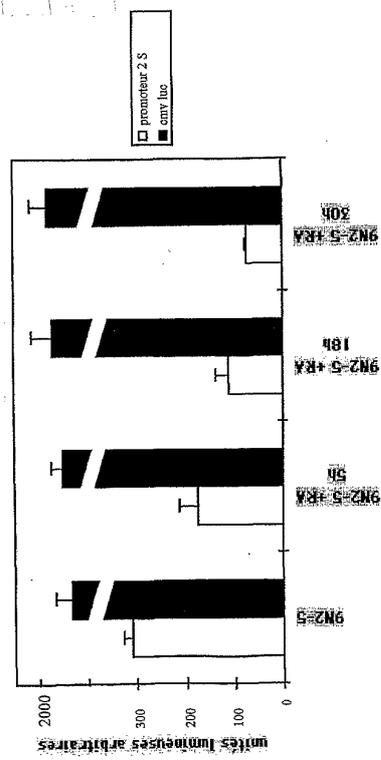


FIG.14

WO 01/85938

PCT/FR01/01207

1

LISTE DE SÉQUENCES

<110> INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE AGRONOMIQUE - INRA
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS
ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE LYON - ENS LYON

<120> CELLULES ES MODIFIÉES ET GÈNE SPÉCIFIQUE DE CELLULES ES.

<130> D18898

<150> FR 00 06029
<151> 2000-05-11

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 4177
<212> ADN
<213> Poulet

<220>
<221> CDS
<222> (1403)..(2881)

<400> 1
cgacagactt gaaggggtct ctgccaactg atctctcaac gcaatgggta gaaggatctc 60
taagtggaga ctgatctctc accacgacac gagcttcttg ccttcogata ctctctacg 120
gcccgtttgc tgacggactt cctctggcct gctacctgag acctgtgtct testcctga 180
cctgcactct ctogctgcc cagacggccc togtgtctc tgcctctgg cctcgaacc 240
teggaccatc gtgcaacggg actgtctgac gatctctgtg gtgactatcc cctctttag 300
caattcttgc ctctttctat ctcttctatc gctcctctc ccttcccat caccocaac 360
cttaatagcg tccgtctctc cctttccca tctccttat taacatttgt aataaactgg 420
teggaccaac atttgaacc ctgtttctta atctcagcc ggcatacat attcaaga 480
acctctctc cctctataa atgggagcga gacattttt atggcgtagt cggcaggata 540
cccgcctga gagtgttgc ctccagata atagtctgaa aotttctgct tgtacctct 600
ggagtgtcaa gaagcgtac ttcttgata cttagcctg agcactctc caggaagatc 660
gcttcatact ctgaaactt actatttatg tgtgtacctc tegaggatgt atgaatttg 720
totaattgta tttatttat actgtgtgct ctctcggga agactctct gcatttltg 780
aacctctctc taagtgtgc cctcttggg aagcaagata cactttttt gaactaaaa 840
actgtgtgct ctcccaagaa gttttctac ttgtctgaaa atgttttatg tatgcaactc 900
tcgagagct atgaactctg tctaatgca ttttaactgt gtgtctctc tcgggaagac 960
ctctctgat ttgtgactt aaggctcttg caacttaagt gtgaaatttg aactcttctc 1020

WO 01/85938

PCT/FR01/01207

2

gtgctgctt cttggggaag ttaggaagtg atacacgttt ttgtattaa aaaacgtgtg 1080
 cgtctctcca agaagtttat tcaactttgtt aatocctagna aagtggtgtt ttgctttaa 1140
 attaactgtg ggitttgaaa cegaagtgtg cofttgettg gtgtgtgttt tgcagttttt 1200
 tgtgtgctt cgcaggggaag ttaggagcga ttttaagtgt gtttagtctc ttgaccttg 1260
 tgotctctcc aacaaggga ggagcaatcg gaacatttac atttcttag ttgtgtgtgtg 1320
 octoogtggg agaggcgata aggaattatt tgaacttttg aataggagta cctcctctct 1380
 csgtctatat cttctgtgt atttggga atg agc aac agt atg gcc agt atg 1432
 Met Ser Asn Ser Met Ala Ser Met
 1 5

aaa agt gaa gat gta tta ttt gat ctt tta gaa aag cat ggt gct cgg 1480
 Lys Ser Glu Asp Val Leu Phe Asp Leu Leu Glu Lys His Gly Ala Arg
 10 15 20

cct tct gta tca ggg ctg gat teg gca cga cag aac tgg tat aat ttg 1528
 Pro Ser Val Ser Gly Val Asp Trp Ala Arg Gln Asn Trp Tyr Asn Leu
 25 30 35 40

caa agt gtt tca gac cgt att cgt gtt tta caa aat gag gct cgt act 1576
 Gln Ser Val Ser Asp Arg Ile Arg Val Leu Gln Asn Glu Ala Arg Thr
 45 50 55

cgg gcc gga aaa ggg aaa tct ttt att tgt gca gta ctg gct gct gct 1624
 Arg Ala Gly Lys Gly Lys Ser Phe Ile Cys Ala Val Leu Gly Ala Ala
 60 65 70

tta aaa gca gct gty gag ttc cga gag gaa aag aac tot acg gaa acc 1672
 Leu Lys Ala Ala Val Glu Phe Arg Glu Glu Lys Asn Ser Thr Glu Thr
 75 80 85

cag agt att caa gca tta cag gaa tcc gtt aaa gtg acg caa gaa ttg 1720
 Gln Ser Ile Gln Ala Leu Gln Glu Ser Val Lys Val Thr Gln Glu Leu
 90 95 100

gta aaa tot ctg caa agc caa ata agg agt ctt gag gat caa tta gaa 1768
 Val Lys Ser Leu Gln Ser Gln Ile Arg Ser Leu Glu Asp Gln Leu Glu
 105 110 115 120

aga gaa aaa cac aat tcc gtt ctg ttg caa ace gct ttt aag gag ctg 1816
 Arg Glu Lys His Asn Ser Val Leu Leu Gln Thr Ala Phe Lys Glu Leu
 125 130 135

ata acg tgt aag gac acc ggt gac act gtt atc cac agt gca cct caa 1864
 Ile Thr Cys Lys Asp Thr Gly Asp Thr Val Ile His Ser Ala Pro Gln
 140 145 150

gaa aaa gtt tat cct caa ggg aaa tta caa gag ctg aag gaa agg cta 1912
 Glu Lys Val Tyr Pro Gln Gly Lys Leu Gln Glu Val Lys Glu Arg Leu
 155 160 165

gat aaa tta gag gcc tct cca gcc cac att cgt cct ttg ata aaa act 1960
 Asp Lys Leu Glu Ala Ser Asp Ala His Ile Arg Pro Leu Ile Lys Thr
 170 175 180

gaa tat act ttc gat aac agt gag aat cta gat cct caa atg aat gtt 2008

WO 01/85938

PCT/FR01/01207

3

Glu Tyr Thr Phe Asp Asn Ser Glu Asn Leu Asp Pro Gln Met Asn Val
 185 190 195 200
 aag gaa att ccc ttt tcy gcc gct gaa ctg gcc aaa ctg aaa aag gat 2056
 Lys Glu Ile Pro Phe Ser Ala Thr Glu Leu Ala Lys Leu Lys Lys Asp
 205 210 215
 ttc agt cgc tcc cca aag gag tct gaa aca gag tac gtc tgg aga gtt 2104
 Phe Ser Arg Ser Pro Lys Glu Ser Glu Thr Glu Tyr Val Trp Arg Val
 220 225 230
 agt ctc act gcc gga gac cag atc cta cta aca gag aaa gaa gct gaa 2152
 Ser Leu Thr Gly Gly Asp Gln Ile Leu Leu Thr Glu Lys Glu Ala Glu
 235 240 245
 ggt tac tgg gga cca gga gta ttt tta acc act gcc aat aat cgt gct 2200
 Gly Tyr Trp Gly Pro Gly Val Phe Leu Thr Thr Gly Asn Asn Arg Ala
 250 255 260
 ccc tgg toc tta aca cag agg gct gcc tat tgg gca ggg ggt ctc aac 2248
 Pro Trp Ser Leu Thr Gln Arg Ala Ala Tyr Trp Ala Gly Gly Leu Asn
 265 270 275 280
 cct tta gaa agg gga gac cct ctt gct att act gga act atc gac cag 2296
 Pro Leu Glu Arg Gly Asp Pro Leu Ala Ile Thr Gly Thr Ile Asp Gln
 285 290 295
 tta gtg gag aat gtt cag aaa gct gct tgt ctc caa atg atg tat gat 2344
 Leu Val Glu Asn Val Gln Lys Ala Ala Cys Leu Gln Met Met Tyr Asp
 300 305 310
 aga aag ttg cag cca cat aat gaa tca ccc atg atg tta cct gtt aat 2392
 Arg Lys Leu Gln Pro His Asn Glu Ser Pro Met Met Leu Pro Val Asn
 315 320 325
 ccg gag aga ctg aca cct cta atc agg gga ctt cct gaa tgg tta aaa 2440
 Pro Glu Arg Leu Thr Pro Leu Ile Arg Gly Leu Pro Glu Ser Leu Lys
 330 335 340
 cct ata ggt ata caa ctc caa gga aag ata caa gcc atg tct cag gga 2488
 Pro Ile Gly Ile Gln Leu Gln Gly Lys Ile Gln Ala Met Ser Gln Gly
 345 350 355 360
 gag aga acc tgg gca gcg ttg gag gga tct gta gcc cct aac cac cag 2536
 Glu Arg Thr Trp Ala Ala Leu Glu Gly Ser Val Ala Pro Asn His Gln
 365 370 375
 tca gga ccc aaa atg tgg act tgg gga gag gtt gcc caa gaa tta atb 2584
 Ser Gly Pro Lys Val Trp Thr Trp Gly Glu Val Ala Gln Glu Leu Ile
 380 385 390
 aac tat gga aga aaa tat ggg ccg gtg gtt tct acc tgc agt aaa ttt 2632
 Asn Tyr Gly Arg Lys Tyr Gly Pro Val Val Ser Thr Cys Ser Lys Phe
 395 400 405
 ggg cca aga gga gta agg ctt gca gta gcc agc ctt gcc tcc agg cct 2680
 Glu Pro Arg Gly Val Arg Leu Ala Val Ala Ser Leu Ala Ser Arg Pro
 410 415 420
 cct agc cca aga ctt att gga acc aaa aag gtt tca tcc caa gta aaa 2728
 Pro Ser Pro Arg Leu Ile Gly Thr Lys Lys Val Ser Ser Pro Val Lys

WO 01/85938

PCT/FR01/01207

5

<210> 2
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> Poulet

<400> 2
 Met Ser Asn Ser Met Ala Ser Met Lys Ser Glu Asp Val Leu Phe Asp
 1 5 10 15
 Leu Leu Glu Lys His Gly Ala Arg Pro Ser Val Ser Gly Val Asp Trp
 20 25 30
 Ala Arg Gln Asn Trp Tyr Asn Leu Gln Ser Val Ser Asp Arg Ile Arg
 35 40 45
 Val Leu Gln Asn Glu Ala Arg Thr Arg Ala Gly Lys Gly Lys Ser Phe
 50 55 60
 Ile Cys Ala Val Leu Gly Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Glu Phe Arg
 65 70 75 80
 Glu Glu Lys Asn Ser Thr Glu Thr Gln Ser Ile Gln Ala Leu Gln Glu
 85 90 95
 Ser Val Lys Val Thr Gln Glu Leu Val Lys Ser Leu Gln Ser Gln Ile
 100 105 110
 Arg Ser Leu Glu Asp Gln Leu Glu Arg Glu Lys His Asn Ser Val Leu
 115 120 125
 Leu Gln Thr Ala Phe Lys Glu Leu Ile Thr Cys Lys Asp Thr Gly Asp
 130 135 140
 Thr Val Ile His Ser Ala Pro Gln Glu Lys Val Tyr Pro Gln Gly Lys
 145 150 155 160
 Leu Gln Glu Val Lys Glu Arg Leu Asp Lys Leu Glu Ala Ser Pro Ala
 165 170 175
 His Ile Arg Pro Leu Ile Lys Thr Glu Tyr Thr Phe Asp Asn Ser Glu
 180 185 190
 Asn Leu Asp Pro Gln Met Asn Val Lys Glu Ile Pro Phe Ser Ala Thr
 195 200 205
 Glu Leu Ala Lys Leu Lys Lys Asp Phe Ser Arg Ser Pro Lys Glu Ser
 210 215 220
 Glu Thr Glu Tyr Val Trp Arg Val Ser Leu Thr Gly Gly Asp Gln Ile
 225 230 235 240
 Leu Leu Thr Glu Lys Glu Ala Glu Gly Tyr Trp Gly Pro Gly Val Phe
 245 250 255
 Leu Thr Thr Gly Asn Asn Arg Ala Pro Trp Ser Leu Thr Gln Arg Ala
 260 265 270
 Ala Tyr Trp Ala Gly Gly Leu Asn Pro Leu Glu Arg Gly Asp Pro Leu
 275 280 285
 Ala Ile Thr Gly Thr Ile Asp Gln Leu Val Glu Asn Val Gln Lys Ala
 290 295 300
 Ala Cys Leu Gln Met Met Tyr Asp Arg Lys Leu Gln Pro His Asn Glu
 305 310 315 320
 Ser Pro Met Met Leu Pro Val Asn Pro Glu Arg Leu Thr Pro Leu Ile
 325 330 335
 Arg Gly Leu Pro Glu Ser Leu Lys Pro Ile Gly Ile Gln Leu Gln Gly
 340 345 350
 Lys Ile Gln Ala Met Ser Gln Gly Glu Arg Thr Trp Ala Ala Leu Glu
 355 360 365
 Gly Ser Val Ala Pro Asn His Gln Ser Gly Pro Lys Val Trp Thr Trp
 370 375 380
 Gly Glu Val Ala Gln Glu Leu Ile Asn Tyr Gly Arg Lys Tyr Gly Pro
 385 390 395 400
 Val Val Ser Thr Cys Ser Lys Phe Glu Pro Arg Gly Val Arg Leu Ala
 405 410 415
 Val Ala Ser Leu Ala Ser Arg Pro Pro Ser Pro Arg Leu Ile Gly Thr
 420 425 430
 Lys Lys Val Ser Ser Pro Val Lys Thr Gly Thr Arg Cys Ile Asp His

WO 01/85938

PCT/FR01/01207

7

<212> ADN
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: Amorce synthétique
 <400> 7
 ocatcctaatacgcactcaact atagggc 27

<210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <223> Gène lacZ.
 <400> 8
 gggatccggc atgtcacaga 20

<210> 9
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Poulet
 <220>
 <223> Amorce.
 <400> 9
 actatcgatt ctggaacctt cagaggtttt tttttttttt tttt 44

<210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Poulet
 <220>
 <223> Amorce.
 <400> 10
 gtcygtgcaac gggactgcct g 21

<210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Poulet
 <220>
 <223> Amorce.
 <400> 11
 ctatcgattc tggaaacctt agagg 25

<210> 12
 <211> 171

WO 01/85938

PCT/FR01/01207

8

<212> ADN
<213> Poulet

<400> 12
tactctctca cggaccgttt gctgacggac ttccctgggc ctgctacctg agacctgctg 60
ctctctccct gacctgcacc ctctcgttgc ccaagaccgg catcactgct ctgacctctc 120
gacctcggac catcggaacg togtgcaacg ggaactgctg tgaatctggg t 171

<210> 13
<211> 18
<212> ADN
<213> Poulet

<220>
<223> Amorce.

<400> 13
agaccggcct cactgctc 18

<210> 14
<211> 21
<212> ADN
<213> Poulet

<220>
<223> Amorce ens1 S1

<400> 14
ggatctagct cctcaaatga a 21

<210> 15
<211> 19
<212> ADN
<213> Poulet

<220>
<223> Amorce ens1 A51

<400> 15
aattcttggg caacctctc 19

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/FR 01/01207
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 G01N33/68 A01K67/027 C07K14/465 C07K16/18 A61K39/395 A61K31/7088 A61K38/17 C12N5/10 C12N15/63 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N A01K C12Q G01N C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EMBL, STRAND, EPO-internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMRI 'Online' accession: AJ397754, 19 February 2000 (2000-02-19) BUERSTEDDE J M ET AL: "Gallus gallus EST clone 30n22r1" XP002164730 cited in the application 97.6% d'identité dans un chevauchement de 619 paires de bases avec SEQ ID NO 1 94.7% d'identité dans un chevauchement de 190 acides aminés avec SEQ ID NO 2 (trasta) --- ---	1, 4, 6, 7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claims) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
2 August 2001		17/08/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 56113 Patentbus 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 346-2000, TX. 51 651 epo.nl, Fax. (+31-70) 346-3016		Authorized officer Devijver, K

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 01/01207

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! accession: AJ393785, 19 February 2000 (2000-02-19) BUERSTEDDE J M ET AL: "Gallus gallus EST clone 16n24r1" XP002164731 cited in the application 93.2% d'identité dans un chevauchement de 752 paires de bases avec SEQ ID NO 1 -----	1,6,7
T	ACLOQUE HERVE ET AL: "Identification of a new gene family specifically expressed in chicken embryonic stem cells and early embryo." MECHANISMS OF DEVELOPMENT, vol. 103, no. 1-2, May 2001 (2001-05), pages 79-91, XP001015571 ISSN: 0925-4773 the whole document	1-45
P,X	-& DATABASE EMBL 'Online! accession: AF327879, 12 February 2001 (2001-02-12) ACLOQUE H ET AL: "Gallus gallus ENS-1 (ens-1) mRNA, complete cds." XP002173838 99.8% d'identité dans un chevauchement de 3970 paires de bases avec SEQ ID NO 1 99.6% d'identité dans un chevauchement de 490 acides aminés avec SEQ ID NO 2 -----	1-7
A	NO 00 12683 A (UNIV NEW YORK) 9 March 2000 (2000-03-09) -----	
A	PAIN B ET AL: "Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities." DEVELOPMENT (CAMBRIDGE), vol. 122, no. 8, 1996, pages 2339-2348, XP002164729 ISSN: 0950-1991 cited in the application -----	

2

Form PCT/ISA210 (continuation of annex sheet July 2002)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 01/01207

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0012683 A	09-03-2000	AU 5696799 A EP 1117765 A	21-03-2000 25-07-2001

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		Demande internationale No PCT/FR 01/01207
A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12N15/12 G01N33/68 A01K67/027 C07K14/465 C07K16/18 A61K39/395 A61K31/7088 A61K38/17 C12N5/10 C12N15/63 C12Q1/68		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTEE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12N A01K C12Q G01N C07K A61K		
Documentation consultée outre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) ENBL, STRAND, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE EMBL 'en ligne! accession: AJ397754, 19 février 2000 (2000-02-19) BUERSTEDDE J M ET AL: "gallus gallus EST clone 30n22r1" XP002164730 cité dans la demande 97.6% d'identité dans un chevauchement de 619 paires de bases avec SEQ ID NO 1 94.7% d'identité dans un chevauchement de 190 acides aminés avec SEQ ID NO 2 (tfasta)	1,4,6,7
<input checked="" type="checkbox"/> Voir le suite de cadre C pour la fin de la liste des documents		
<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant être un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou à une autre technique *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour compléter le principe ou la théorie constituant la base de l'invention ** document partiellement pertinent: l'inven tion revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *** document partiellement pertinent: l'inven tion revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *G* document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 2 août 2001		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 17/08/2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P. B. 5818 Patentstrasse 2 NL - 2220 SB Rijswijk Tél. (+31-70) 340-2000, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3036		Fonctionnaire autorisé Devijver, K

Formule PCTISA/210 (deuxième partie) (juin 1999)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 01/01207

C(é)l(s) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des sous-citations visées
X	<p>DATABASE EMBL 'en ligne! accession: AJ393785, 19 février 2000 (2000-02-19) BUERSTEDDE J M ET AL: "Gallus gallus EST clone 16n24r1" XP002164731 cité dans la demande 93.2% d'identité dans un chevauchement de 752 paires de bases avec SEQ ID NO 1 ----</p>	1,6,7
T	<p>ACLOQUE HERVE ET AL: "Identification of a new gene family specifically expressed in chicken embryonic stem cells and early embryo." MECHANISMS OF DEVELOPMENT, vol. 103, no. 1-2, mai 2001 (2001-05), pages 79-91, YP001015571 ISSN: 0925-4773 le document en entier -& DATABASE EMBL 'en ligne! accession: AF327879, 12 février 2001 (2001-02-12) ACLOQUE H ET AL: "Gallus gallus ENS-1 (ens-1) mRNA, complete cds." XP002173838 99.8% d'identité dans un chevauchement de 3970 paires de bases avec SEQ ID NO 1 99.6% d'identité dans un chevauchement de 490 acides aminés avec SEQ ID NO 2 ----</p>	1-45
P,X	<p>NO DC 12683 A (UNIV NEW YORK) 9 mars 2000 (2000-03-09) ----</p>	1-7
A	<p>PAIN B ET AL: "Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities." DEVELOPMENT (CAMBRIDGE), vol. 122, no. 8, 1996, pages 2339-2348, XP002164729 ISSN: 0950-1991 cité dans la demande ----</p>	

2

Formulaire PCT/AM/210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE			Demande internationale No	
Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets			PCT/FR 01/01207	
Document breveté ou rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication	
WO 0012683 A	09-03-2000	AU 5696799 A EP 1117765 A	21-03-2000	25-07-2001

Formulaire PCT/ISA/210 (version famille de brevets) (juillet 1999)

Demande internationale No. PCT/FR 01 01207

SUIITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 43,44(f)

Les revendications 43 et 44(f) présentes ont trait à une très grande variété de composés et de produits, non-divulgués au sens de l'Article 6 PCI et/ou au sens de l'Article 5 PCT (substance ou milieu capables d'induire une différenciation de cellules pluripotentes; substance capable de restaurer le caractère pluripotent de cellules différenciées). Dans le cas présent, une recherche significative est impossible pour les revendications 43 et 44(f).

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	N 4 C 0 8 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 7
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5 4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/465	C 0 7 K 14/465	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/577	Z
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	B
	C 1 2 N 15/00	F
	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(71) 出願人 502407451

エエヌエス - エコール・ノルマル・スペリウール・ドゥ・リヨン

ENS - ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON

フランス国、69000リヨン、アレ・ダタリ、46

(74) 代理人 100081352

弁理士 広瀬 章一

(72) 発明者 アクロク、エルベ

フランス国、69007リヨン、リユー・アンドレ・ポリエール、87

(72) 発明者 ビロ、アンヌ - マリー

フランス国、69110サント - フオワ - レ - リヨン、リユー・デュ・プラニ、3

(72) 発明者 リソン、バレリー

フランス国、69003リヨン、リユー・ポール・ベール、12

(72) 発明者 パン、ベルトラン

フランス国、69003リヨン、プラス・ビル・アケム、4

(72) 発明者 サマル、ジャック

フランス国、69100ビルールバンヌ、ルトゥ・ドゥ・ジュナ、169ビス

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA43 BA80 CA04 CA09 CA12 DA02 EA04 FA04

FA07 FA10 GA14 HA14 HA15

4B063 QA08 QA18 QQ20 QQ22 QQ42 QQ53 QQ79 QR55 QR60 QR62

QR77 QR80 QR82 QS05 QS24 QS25 QS28 QS34 QS36

4B064 AG01 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46

4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 BA44 CA53

专利名称(译)	修饰的ES细胞和ES细胞特异性基因		
公开(公告)号	JP2004515212A	公开(公告)日	2004-05-27
申请号	JP2001582527	申请日	2001-04-19
[标]申请(专利权)人(译)	安妮住饱和呐格哈德织日拉尔外壳拉邦农业跳蚤点击 中心国立拉尔外壳格哈德青色T恤的费用在习惯NTT强麦ES 法国国家科学研究中心 ENS - 巴黎高等师范学院里昂		
申请(专利权)人(译)	Ansuteiteyu, Nashuonaru德拉RECHERCHE, Aguronomiku 全国中心德拉RECHERCHE, 青色T恤费点击(保存NTT耶鲁ES) Eenuesu - 巴黎高等师范学院Superiuru里昂		
[标]发明人	アクロクエルベ ビロアンヌマリー リソンバレリー パンベルトラン サマルジャック		
发明人	アクロク、エルベ ビロ、アンヌ-マリー リソン、バレリー パン、ベルトラン サマル、ジャック		
IPC分类号	G01N33/53 A01K67/027 A61K31/7088 A61K35/12 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P43/00 C07K14/465 C07K16/18 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21 /02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/566 G01N33/577		
CPC分类号	A01K67/0275 A01K2217/05 A61K38/00 A61K39/00 A61P43/00 C07K14/465		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K35/12 A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P43/00.105 C07K14/465 C07K16/18 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53. D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/577.Z C12N5/00.B C12N15/00.F A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024 /DA02 4B024/EA04 4B024/FA04 4B024/FA07 4B024/FA10 4B024/GA14 4B024/HA14 4B024/HA15 4B063/QA08 4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QQ22 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063 /QR55 4B063/QR60 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS05 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064 /CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084 /AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/CA62 4C084/DA01 4C084/NA14 4C084/ZB212 4C084/ZC022 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085 /BB11 4C085/CC04 4C085/CC32 4C085/EE01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB21 4C086/ZC02 4C087/AA02 4C087/BB63 4C087/BB65 4C087 /BC83 4C087/NA14 4C087/ZB21 4C087/ZC02 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045 /FA74		
优先权	2000006029 2000-05-11 FR		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

本发明涉及一种修饰的禽ES细胞，其在具有多能性时特异性地表达外源基因。本发明还涉及在多能禽类细胞中特异性表达的核酸和多肽，以及使用所述核酸和多肽检测细胞多能性的方法。

