

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **218931**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **397040**

(22) Data zgłoszenia: **18.11.2011**

(51) Int.Cl.

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

(54)

**Sposób otrzymania komórek epitelialnych z jajowodu kury
w hodowli pierwotnej in vitro**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

27.05.2013 BUP 11/13

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

27.02.2015 WUP 02/15

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Technologiczno-
-Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja
Śniadeckich w Bydgoszczy,
Bydgoszcz, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MAREK BEDNARCZYK, Bydgoszcz, PL
KATARZYNA KASPERCZYK, Bydgoszcz, PL**

(74) Pełnomocnik:

recz. pat. Piotr Jankowski

PL 218931 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymania komórek epitelialnych z jajowodu kury w hodowli pierwotnej *in vitro*, jako wyjściowa hodowla komórek do produkcji linii komórek kurzych, jak również jako model komórek kurzych do opracowania nowych odczynników do hodowli komórkowych, oraz do stosowania w przemyśle biofarmaceutycznym np. jako model biologiczny do testowania genowych nośników przy produkcji rekombinowanych białek o znaczeniu terapeutycznym. Komórki OECs mogą być wykorzystane również do testowania działania konstruktów genowych z promotorami specyficznymi tkankowo oraz do otrzymywania egzogennych białek *in vitro* metodami transformacji genetycznej bez wykorzystania potencjalnie niebezpiecznych cząstek wirusowych.

Model organizmu kury domowej wykorzystywany jest szeroko w badaniach medycznych i w inżynierii genetycznej. Ostatnio intensywnie wzrosła, o ponad 50% w skali 5 lat, liczba publikacji rozważających wykorzystanie ptasich komórek jajowodu jako przydatnego modelu do badań m.in. nad bioreaktorami zwierzęcymi. Komórki o charakterze nabłonkowym można utrzymać *in vitro* do 7 dni w warunkach hodowli pierwotnej. Stwierdzono, że skuteczne utrzymanie kultur komórek nabłonka jajowodu kury przez dłuższy okres czasu z możliwością pasażowania odnosi się do linii komórkowych utworzonych z komórek hybrydowych w wyniku fuzji ptasich komórek gruczołowych rurkowatych jajowodu z komórkami nieśmiertelnymi.

W dotychczasowym stanie techniki nie jest znana żadna dostępna komercyjnie linia normalnych komórek COEC. Oferowane są zestawy komórek ptasich, jednak nie są to linie normalnych COEC do wykorzystania m.in. jako model do badań *in vitro* (Charles River Laboratories International Inc. USA, ATTC-LGC).

Dotychczas wyłącznie totipotentne komórki blastodermalne i pierwotne komórki płciowe były rozważane jako komórki o charakterze komórek macierzystych do wykorzystania przy manipulacjach genetycznych komórek ptaków w celu otrzymania odziedzicznego efektu trwałej transgenezy. Jednak, bardziej adekwatne w produkcji transgeniczných ptaków byłoby biotechnologiczne wykorzystanie komórek jajowodu, które są odpowiedzialne za wytwarzanie docelowych białek w jajach, np. białek terapeutycznych. Potrzebne są nowe, powtarzalne metody hodowli komórek jajowodu w celu rozwijania badań nad transgenezą i ich wykorzystania w produkcji.

Swoistą właściwością jajowodu kury jest możliwość regularnej produkcji dużej ilości białka w jajach w regularnych odstępach czasu, np. u kury wyselekcjonowanej rasy White Leghorn roczna produkcja jaj może sięgać 330 sztuk z zawartością do 2200 g białka. W tym, ponad 50% białka może stanowić owoalbumina. Promotor owoalbuminy zastosowany w konstrukcie genowym użytym podczas transgenezy może specyficznie kierować obce geny (egzogeny) do komórek jajowodu, w których geny te ulegną dalej ekspresji.

Poszukiwane są efektywne metody nie wirusowego otrzymywania komórek jajowodu kury, które zawierałyby sekwencje DNA kodujące heterologiczne białka np. ludzkie białka terapeutyczne ulegające ekspresji pod wpływem specyficznego promotora. Produkcję transgeniczných ptaków ocenia się obecnie jako najbardziej efektywny sposób wywołania ekspresji obcych białek.

W opisie patentu US 7351582 podanych jest szereg aplikacji, które opierają się na metodach mogących służyć produkcji transgeniczných ptaków jako zwierzęcych bioreaktorów do otrzymania obcych (egzogennych) białek.

Jajowód ptaka składa się z 5 podstawowych segmentów: lejka jajowodu (łac. *Infundibulum*), części białkotwórczej (łac. *Magnum*), cieśni jajowodu (łac. *Isthmus*), gruczołu skorupowego czyli macicy (łac. *Uterus*) oraz ujścia jajowodu (łac. *Vagina*) stosuje się również inne metody niż sposób wynalazku: np. z tkanki jajowodu pobiera się część białkotwórczą *Magnum*, kolejno za pomocą enzymów np. kolagenazy lub dispazy, wytrawia się tkankę aby uzyskać agregaty komórek nadające się do krótkotrwałej hodowli *in vitro*. Jednak w okresie do 3 dni hodowli *in vitro* komórki takie ulegają procesom różnicowania i apoptozy (śmierci), które eliminują je jako potencjalne bioreaktory do produkcji heterologicznych białek.

Poszukuje się takiej metody hodowli komórek OECs *in vitro* aby otrzymać proliferujące holoklony komórek o charakterze epitelialnym, które utrzymałyby swój prawidłowy charakter co najmniej przez 7 dni. Jednak, opisane w literaturze metody są w dużej mierze niepowtarzalne. Izolacja komórek z odcinka *magnum* jajowodu nie gwarantuje sukcesu hodowli *in vitro*.

Do niedawna problemem było opracowanie wydajnych metod trwałego wprowadzania genów do komórek hodowanych *in vitro*. Bardzo wydajne w transfekcji komórek ptasich są wektory wirusowe.

Jednak przy wysokiej wydajności wirusy mają wiele wad, które dyskwalifikują je jako metodę uniwersalną. M.in. mogą wywoływać odpowiedź immunologiczną w organizmie biorcy, a ich przygotowanie jest długotrwałe i wymaga dużych nakładów finansowych. Istnieje również niebezpieczeństwo rekombinacji wprowadzonych cząsteczek z innymi patogennymi szczepami bytującymi w organizmie. Ponadto, genom wirusa ma ograniczoną wielkość uniemożliwiając wprowadzenie dłuższych fragmentów DNA, które są niezbędne do prawidłowej ekspresji obcego genu. Rozwiązaniem stosowanym do tej pory było wykorzystanie dużych cząstek lentiwirusów o wysokim stopniu inwazyjności komórkowej.

Z uwagi na te cechy poszukuje się innych bezpieczniejszych nie wirusowych procedur. Jedną z alternatyw dla wirusów są syntetyczne nośniki DNA. Wydajność syntetycznych nośników DNA jest wypadkową kilku procesów: siłą transportu kompleksów do komórek docelowych, wnikaniem DNA do wnętrza komórki, uwolnieniem do cytoplazmy, wniknięciem do jądra, transkrypcją i ekspresją obcego genu, czy wreszcie stopniem toksyczności użytych związków chemicznych. W świetle powyższego poszukiwano ujednoliconego sposobu otrzymania komórek OECs *in vitro*, powtarzalny w wynikach i tańszy w porównaniu do innych modeli komórkowych. Potrzebny jest ujednolicony protokół do testowania dostępnych na rynku nośników egzogenów lub do opracowania nowych metod bezpiecznej nie wirusowej transfekcji ptasich komórek w celu otrzymania heterologicznych białek. Wiadomo, że jajowód odgrywa wiodącą rolę w procesie reprodukcji stanowiąc optymalne środowisko do wzrostu i dojrzewania żeńskich komórek rozrodczych a także do przebiegu zapłodnienia i regulacji wielu innych mechanizmów. Poszukiwana jest powtarzalna metoda otrzymywania komórek OECs do wykorzystania jako model *in vitro* w szerokim spektrum badań podstawowych dotyczących m.in. mechanizmów regulacji hormonalnej, rozwoju komórek i nowotworów związanych z jajowodem. Każdy organ i tkanka posiadają specyficzne miejsca występowania odpowiadających im nisz komórek epitelialnych. Np. rejon rąbka rogowki jest miejscem ulokowania progenitorowych komórek rogowki oka, a komórki progenitorowe jelit mają swoją lokalizację ponad dnem krypt jelitowych. Poznanie lokalizacji nisz komórek macierzystych/progenitorowych jest ważnym czynnikiem odpowiedzialnym za prawidłową izolację komórek i za szansę na uzyskanie homogenicznej hodowli *in vitro*.

W świetle powyższego, poszukiwany jest sposób otrzymania komórek OECs do zastosowania jako model *in vitro* do weryfikacji hipotez dotyczących źródeł komórek progenitorowych dla jajowodu.

Istotą sposobu wg wynalazku jest otrzymanie komórek epitelialnych z jajowodu kury w hodowli pierwotnej *in vitro* polegający na łącznym zastosowaniu czynników wpływających na powodzenie hodowli *in vitro* komórek OECs, powodujących optymalne warunki do otrzymania hodowli *in vitro* komórek OECs, poprzez izolację komórek z określonego miejsca w jajowodzie ptaka, dolnego, rurkowatego odcinka szyjki *infundibulum* jajowodu, prowadzenie hodowli *in vitro* normalnych komórek OECs z wykorzystaniem medium do bez surowicy, zastosowanie zwykłej polistyrenowej powierzchni naczyń do hodowli *in vitro*, bez konieczności opłaszczania dodatkowymi czynnikami potencjalnie zwiększającymi adhezję komórek, czas trawienia fragmentów tkanki jajowodu wynoszący 15-45 min., np. 30 min. temperatura utrzymywana podczas hodowli *in vitro* w inkubatorze wysyconym atmosferą 5% CO₂ wynosząca 37.5°C lub 41.0°C, wysiewanie *in vitro* startowej liczby komórek OECs od 0,5 x 10⁶ do 1,5 x 10⁶ przypadającą na powierzchnię od 3 do 4 cm² naczyń do hodowli komórek *in vitro*.

W sposobie wg wynalazku pobieramy *post mortem* tkankę jajowodu od ptaków w okresie nieśności, następnie z jajowodu wycinamy odcinek lejka jajowodu (łac. *Infundibulum*) stanowiący od 2 cm do 5 cm dł. odcinek szyjki lejka jajowodu, tak pozyskaną tkankę jajowodu odpłukujemy z pozostałości tkanki łącznej w roztworze soli fizjologicznej ogrzanym do fizjologicznej temperatury ptaka (41°C), z dodatkiem roztworu penicyliny/streptomycyny w zakresie od 1:20 do 1:100. Następnie układamy wstępnie oczyszczoną tkankę jajowodu na płytkę Petriego, po czym odcinamy lub zdzieramy resztki *mesenterium* (krezka) oraz *tunica serosa* (błona surowicza) jajowodu. Kolejno, tkankę *Infundibulum* jajowodu przecinamy i układamy na powierzchni płytki Petriego eksponując powierzchnię ścian jajowodu. Po czym, jeszcze raz odrywamy pozostałości *tela suberosa* (tkanka podsurowicza) i tkanki naczyniowej oraz płuczemy tkankę jajowodu w PBS, opcjonalnie z dodatkiem antybiotyków penicyliny i amfoterycyny B. Następnie, tkankę szatkujemy za pomocą skalpela na fragmenty o powierzchni od ok. 2 mm² do 5 mm². Na zakończenie, przenosimy całość poszatkowanej tkanki jajowodu do sterylnej probówki wirówkowej o obj. 45ML w celu poddania procedurze trawienia enzymami np. kolagenazą lub dispazą. Podczas inkubacji z enzymem w inkubatorze wysyconym atmosferą 5% CO₂, w temperaturze 37,5°C lub 41°C zwracamy uwagę na regularne wytrząsanie r-ru z tkanką i enzymem, np. co 5-10 minut. W ten sposób traktujemy tkankę jajowodu enzymatycznie od 15 do 45 minut. Natychmiast po upływie czasu trawienia probówkę z tkanką jajowodu poddajemy wirowaniu przez 10-30 min. przy

prędkości wirowania 500-700 RCF, w temp. 4°C. Odwirowany tzw. pierwszy supernatant zlewamy do nowej probówki wirówkowej i wirujemy przez 5-15 min, aż uzyskamy tzw. Druki supernatant. Osady uzyskane z pierwszego i drugiego supernatantu zawieszamy w 5-15 ML *medium* DMEM i poddajemy filtrowaniu przez sita molekularne o średnicy 80-120 µm. Następnie, zawiesinę komórek po filtrowaniu wirujemy co najmniej 2-krotnie, przez okres 5-15 minut przy prędkości wirowania od 500 do 700 RCF, w temp. 4°C. Ostatecznie zawieszamy komórki w 2-5ML *medium* do hodowli komórek *in vitro* i przystępujemy do oceny przeżywalności i liczby wyizolowanej populacji komórek OECs, np. konwencjonalną metodą mikroskopową z wykorzystaniem komory do zliczania komórek. Do płukania komórek OECs podczas izolacji z tkanki jajowodu używamy *medium* DMEM bez surowicy. Do hodowli OEC *in vitro* używamy polistyrenowej powierzchni naczyń do hodowli komórek *in vitro* - np. o powierzchni jednego dołka wynoszącej od 3 do 5 cm². Na taką powierzchnię możemy wysiać od $0,5 \times 10^6$ do $1,0 \times 10^6$ uzyskanych komórek OEC. Do hodowli *in vitro* stosujemy *medium bez surowicy*, zdefiniowane może być z dodatkiem hormonów insulina i estradiol. W celu zapobiegania rozwojowi mikoplazmy możemy dodawać preparat przeciw mykoplazmatyczny. Medium hodowlane w czasie procesu hodowli komórek *in vitro* wymieniamy na świeże co 2-3 dni.

W znanych sposobach nie ma ustalonej linii normalnych komórek nabłonkowych kury, a tym bardziej linii komórek jajowodu. Wynalazek może być wykorzystywany jako model do wypracowania nowych komercyjnych linii komórek kurzych np. poprzez transformacje komórek uzyskanych za pomocą wynalazku w kierunku nieśmiertelnienia. Nie istnieje ujednolicony model sposobu otrzymania normalnych komórek OECs *in vitro*.

Sposób wg wynalazku umożliwia rutynowe korzystanie z metody izolacji normalnych OECs i prowadzenie intensywnych testów np. komercyjnych czynników transfekcyjnych, komercyjnych konstruktorów tkankowo - specyficznych lub innych komercyjnych odczynników do hodowli komórkowych *in vitro*.

Zaletami przedmiotowego rozwiązania w stosunku do rozwiązań istniejących jest powtarzalność w wykonaniu, mniejsza czasochłonność i pracochłonność np. nie wymaga mechanicznego usuwania kontaminantów (np. komórek fibroblastów) podczas prowadzenia hodowli *in vitro*, w porównaniu do opisanych wcześniej metod, bezpieczeństwo stosowania, ponieważ wykorzystujemy media bez surowicy czyli bez białek odzwierzęcych, oraz innowacyjność - wskazuje na nowy komórkowy model badawczy np. do testowania markerów komórek macierzystych w jajowodzie.

Cechy innowacyjne wynalazku łączne zastosowanie optymalnych wariantów czynników wymienionych wyżej, w szczególności zaś 2 kluczowych czynników: izolacji komórek z miejsca *infundibulum* jajowodu, stosowanie w hodowli *in vitro* zdefiniowanego medium bez surowicy w celu otrzymania proliferujących holoklonów komórek nabłonka jajowodu w hodowli *in vitro*. Zastosowanie modelu *in vitro* komórek jajowodu otrzymanego powyższą metodą do przeprowadzenia transfekcji i wprowadzenia obcych genów np. ludzkich białek terapeutycznych bez wykorzystania cząstek wirusowych jako wektorów transfekcji, zastosowanie modelu *in vitro* komórek jajowodu kury otrzymanego powyższą metodą do opracowania metody otrzymywania egzogennych białek *in vitro* metodami transformacji genetycznej i oceny ich ekspresji.

Dodatkową zaletą metody jest to, że metoda sama w sobie nie wymaga stymulacji hormonalnej ptaków wykorzystywanych w doświadczeniu ani dodatku substancji hormonalnych ponad to, co już jest zawarte w medium hodowlanym co wpływa na dobrostan zwierząt doświadczalnych i na bezpieczeństwo pracy.

Sposób wg wynalazku przedstawiono szczegółowo w przykładach realizacji.

Przykład I

Wykorzystanie wynalazku jako modelu *in vitro* do testowania konstruktorów genowych niosących sekwencje kodujące obce białka markerowe np. białko zielonej fluorescencji (GFP ang. *Green fluorescence protein*), z użyciem niewirusowych wektorów (nośników) lub specjalistycznych urządzeń do transfekcji adherentnych komórek np. 4D-Nucleofector System (Lonza Cologne AG, Niemcy) oraz z użyciem promotorów tkankowo-specyficznych np. genu białka jaja owoalbuminy.

W tym celu pozyskano hodowlę *in vitro* komórek OECs z jajowodu kury metodą opisaną wyżej. Komórki OECs w takiej hodowli będące holoklonami (komórki o najwyższym potencjale namnażania się) ulegały proliferacji (namnażaniu) w formie kolonii adherentnych czyli przyczepionych do podłoża naczynia. W przypadku, gdy kolonie komórek OECs w naczyniu hodowlanym osiągały niemniej niż 40% konfluencji czyli ciągłości wzrostu (% - stopień pokrycia naczynia hodowlanego), przystępowano do transfekcji komórek za pomocą komercyjnego odczynnika do transfekcji (np. Fugene®6, Roche

Diagnostics). Transfekcja miała na celu sprawdzenie, czy wprowadzony do komórek przykładowy konstrukt genowy zawierający sekwencję genu białka markerowego np. GFP spowoduje ekspresję tego białka w komórkach OECs i świecenie pod wpływem światła UV. Ekspresję GFP w komórkach OECs można analizować pod odwróconym mikroskopem fluorescencyjnym lub pod mikroskopem konfokalnym NICON (Rys. 3). Preparat fluorescencyjny z DAPI wykazał sygnały fluorescencji we wnętrzu adherentnych komórek OECs; obserwacja pod mikroskopem konfokalnym NICON, powiększenie obiektu 100x.

Przykład II

Wykorzystanie wynalazku jako modelu *in vitro* do identyfikacji obcego genu np. kodującego ludzkie białko terapeutyczne IFN alfa 2a, w wyniku transfekcji komórek OECs z użyciem niewirusowych wektorów (nośników) oraz z użyciem promotorów tkankowo-specyficznych np. genu białka jaja owoalbuminy. W tym celu pozyskano hodowlę *in vitro* komórek OECs z jajowodu kury metodą opisaną wyżej. Komórki OECs w takiej hodowli będące holoklonami (komórki o najwyższym potencjale namnażania się) ulegały proliferacji (namnażaniu) w formie kolonii adherentnych czyli przyczepionych do podłoża naczynia. W przypadku, gdy kolonie komórek OECs w naczyniu hodowlanym osiągały nie mniej niż 40% konfluencji czyli ciągłości wzrostu (% - stopień pokrycia naczynia hodowlanego), przystępowano do transfekcji komórek za pomocą komercyjnego odczynnika do transfekcji (np. Fugene®6, Roche Diagnostics). Transfekcja miała na celu sprawdzenie, czy wprowadzony do komórek przykładowy konstrukt genowy zawierający sekwencję genu obcego białka np. ludzkiego hIFN alfa 2a spowoduje ekspresję tego białka w komórkach OECs. Obecność obcego genu hIFN alfa 2a w komórkach OECs można identyfikować protokołem PCR, np. wg Sławińska i in., 2008. Analiza PCR wykazała obecność prążka hINT o wielkości molekularnej 713bp w 38% przygotowanych ekstraktów z komórek COEC (Rys. 4). Ekspresję obcego genu hIFN alfa 2a w komórkach OECs można identyfikować protokołem Western Blotting, z użyciem reakcji przeciwciał: pierwszorzędowego przeciwciała mysiego skierowanego przeciw hIFN alfa 2a oraz drugorzędowego przeciwciała np. poliklonalnego przeciwciała koziego reagującego z epitopami przeciwciała mysiego.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymania komórek epitelialnych z jajowodu kury w hodowli pierwotnej *in vitro*, **znamienny tym**, że komórki izoluje się z dolnego odcinka szyjki *infundibulum* jajowodu, przy czym hodowla prowadzona jest z komórek OECs z wykorzystaniem medium bez surowicy, przy zastosowaniu polistyrenowej powierzchni naczyń do hodowli, zaś czas trawienia tkanki jajowodu wynosi 15-45 min., temperatura wynosi 37.5°C, przy wysyceniu atmosferą 5% CO₂, a wysiewanie *in vitro* startowej liczby komórek OECs od 0,5 x 10⁶ do 1,5 x 10⁶ przypada na powierzchnię od 3 do 4 cm².

2. Sposób otrzymania komórek epitelialnych z jajowodu kury w hodowli pierwotnej *in vitro*, **znamienny tym**, że z jajowodu wycina się odcinek lejka, następnie płucze się w roztworze soli fizjologicznej w temperaturze korzystnie 41°C, z dodatkiem roztworu penicyliny/streptomycyny w zakresie od 1:20 do 1:100, następnie odcina się resztki *mesenterium* (krezka) oraz *tunica serosa* (błona surowicza), po czym tkankę *Infundibulum* jajowodu przecina się i odrywa pozostałości *tela suberosa* (tłanka podsurowicza) i tkanki naczyniowej po czym płucze się w PBS, następnie, tkankę szatkuje się na fragmenty o powierzchni korzystnie od ok. 2 mm² do 5 mm² i poddaje procedurze trawienia enzymami i inkubacji z enzymem w atmosferze 5% CO₂, i temperaturze 35-45°C przez okres 15-45 minut, po czym poddaje wirowaniu przez 10-30 min. przy prędkości 500-700 RCF, w temp. 4°C, po czym odwirowany tzw. pierwszy supernatant wirujemy przez 5-15 min, do uzyskania drugiego supernatantu, przy czym osady uzyskane z pierwszego i drugiego supernatantu zawiesza się w 5-15 ML medium DMEM i poddaje filtrowaniu przez sita molekularne o średnicy 80-120 µm, następnie, zawiesinę komórek po filtrowaniu wiruje się od 5-15 minut z prędkością od 500 do 700 RCF, w temp. 4°C, po czym ostatecznie zawiesza się komórki w 2-5ML.

