



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 495**

51 Int. Cl.:
C12N 15/00 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98954994 .4**
96 Fecha de presentación : **15.10.1998**
97 Número de publicación de la solicitud: **1023442**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2000**

54 Título: **Aves transgénicas y producción de proteína.**

30 Prioridad: **16.10.1997 US 62172 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.04.2011

73 Titular/es:
**University of Georgia Research Foundation, Inc.
623 Boyd Graduate Studies Research Center
Athens, Georgia 30602-7411, US
SYNAGEVA BIOPHARMA Corp.**

72 Inventor/es: **Ivarie, Robert, D.;**
Harvey, Alex, J.;
Morris, Julie, A.;
Liu, Guodong y
Rapp, Jeffrey C.

74 Agente: **Justo Bailey, Mario de**

ES 2 357 495 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aves transgénicas y producción de proteína.

5 **Antecedentes de la invención**a) **Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a procedimientos para la introducción de material genético exógeno en células aviares y la expresión del material genético exógeno en las células. La invención también se refiere a especies aviares transgénicas, que incluyen pollos, que producen huevos aviares que contienen proteína exógena.

b) **Descripción de la técnica relacionada**

15 Se usan numerosas proteínas naturales y sintéticas en aplicaciones diagnósticas y terapéuticas; muchas otras están en desarrollo o en ensayos clínicos. Los procedimientos actuales de producción de proteínas incluyen el aislamiento a partir de fuentes naturales y la producción recombinante en células bacterianas y de mamíferos. Sin embargo, debido a la complejidad y al alto coste de estos procedimientos de producción de proteínas, se están realizando esfuerzos para desarrollar alternativas. Por ejemplo, se han notificado procedimientos para producir proteínas exógenas en la leche de cerdos, ovejas, cabras y vacas. Estas aproximaciones se ven afectadas por varias limitaciones, incluyendo tiempos de generación largos entre rebaños fundadores y de producción transgénica, ganadería extensiva y costes veterinarios, y niveles variables de expresión debido a los efectos de posición en el sitio de la inserción transgén en el genoma. Las proteínas también se producen usando procedimientos de molienda y malteado a partir de cebada y centeno. Sin embargo, las modificaciones postraduccionales de las plantas se diferencian de las modificaciones postraduccionales de los vertebrados, lo que a menudo tiene un efecto crítico en la función de las proteínas exógenas.

20 Al igual que un biorreactor de cultivo de tejido y de glándula mamaria, el oviducto aviar también puede servir potencialmente como un biorreactor. Los procedimientos exitosos de modificación del material genético aviar son tales que se secretan altos niveles de proteínas exógenas en y se empaquetan dentro de huevos permitirían la producción económica de grandes cantidades de proteína. Diversas ventajas de una aproximación de este tipo serían: a) tiempos de generación cortos (24 semanas) y establecimiento rápido de bandadas transgénicas por medio de inseminación artificial; b) producción fácilmente a escala incrementando los tamaños de bandadas para cumplir con las necesidades de producción; c) modificación postraduccional de proteínas expresadas; 4) alimentación automatizada y recogida de huevos; d) claras de huevo estériles de manera natural y e) costes de procesamiento reducidos debido a la concentración alta de proteína en la clara de huevo.

25 El sistema reproductivo aviar, que incluye el del pollo, se ha descrito bien. El huevo de la gallina consta de diversas capas que se secretan sobre la yema durante su paso a través del oviducto. La producción de un huevo comienza con la formación de la yema grande en el ovario de la gallina. Entonces, el ovocito no fertilizado se posiciona sobre el saco vitelino. Tras la ovulación o la liberación de la yema desde el ovario, el ovocito pasa a través del infundíbulo del oviducto, en el que se fertiliza si está presente el esperma. Entonces, se mueve dentro del magno del oviducto que está recubierto con células de glándulas tubulares. Estas células secretan las proteínas de la clara de huevo, que incluyen *ovoalbúmina*, lisozima, ovomucoide, conalbúmina y ovomucina, dentro del lumen del magno donde se depositan sobre el embrión aviar y la yema.

30 El gen de *ovoalbúmina* codifica una proteína de 45 kD se expresa de manera específica en las células de glándulas tubulares del magno del oviducto (Beato, Cell 56:335-344 (1989)). La *ovoalbúmina* es la proteína de la clara de huevo más abundante, que comprende más del 50 por ciento de la proteína total producida por las células de glándulas tubulares, o aproximadamente 4 gramos de proteína por huevo de categoría A grande (Gilbert, "Egg albumen and its formation" en Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl, Bell y Freeman, eds., Academic Press, Londres, Nueva York, pág. 1291-1329). Se han clonado el gen de *ovoalbúmina* y más de 20 kb de cada región flanqueante y se han analizado (Lai *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 75:2205-2209 (1978); Gannon *et al.*, Nature 278:428-424 (1979); Roop *et al.*, Cell 19:63-68 (1980); y Royal *et al.*, Nature 279:125-132 (1975)).

35 Se ha prestado mucha atención a la regulación del gen de *ovoalbúmina*. El gen responde a hormonas esteroideas tales como estrógeno, glucocorticoides y progesterona, que inducen la acumulación de aproximadamente 70.000 transcritos de ARNm de *ovoalbúmina* por célula de glándulas tubulares en polluelos inmaduros y 100.000 transcritos de ARNm de *ovoalbúmina* por célula de glándulas tubulares en la gallina ponedora madura (Palmiter, J. Biol. Chem. 248:8260-8270 (1973); Palmiter, Cell 4:189-197 (1975)). El análisis de hipersensibilidad de ADNsa y los ensayos de gen promotor-indicador en células de glándulas tubulares transfectadas definieron una región de 7,4 kb que contenía secuencias requeridas para la expresión del gen de la *ovoalbúmina*. Esta región 5' flanqueante contiene cuatro sitios de hipersensibilidad 1 de ADNsa centrados en -0,25, -0,8, -3,2 y -6,0 kb desde el sitio de comienzo de transcripción. Estos sitios se denominan HS-I, -II, -III y -IV, respectivamente. Estas regiones reflejan alteraciones en la estructura de la cromatina y están correlacionadas de manera específica con la expresión del gen de la *ovoalbúmina* en células del oviducto (Kaye *et al.*, EMBO 3:1137-1144 (1984)). La hipersensibilidad de HS-II y de -III está inducida por estrógeno, apoyando la función de estas regiones en la inducción de hormonas de la expresión del gen de la *ovoalbúmina*.

Se requieren tanto HS-I como HS-II para la inducción esteroidea de la transcripción del gen de la *ovoalbúmina*, y es suficiente una porción de 1,4 kb de la región 5' que incluya estos elementos para conducir la expresión de la *ovoalbúmina* dependiente de esteroides en células de glándulas tubulares explantadas (Sanders y McKnight, *Biochemistry* 27: 6550-6557 (1988)). HS-I se denomina como el elemento de respuesta negativa ("ERN") ya que contiene diversos elementos reguladores negativos que reprimen la expresión de la *ovoalbúmina* en ausencia de hormona (Haekers *et al.*, *Mol. Endo.* 9:1113-1126 (1995)). Los factores de la proteína unen estos elementos, que incluyen algunos factores que sólo se encuentran en el núcleo del oviducto lo que sugiere un papel en la expresión específica de tejido. HS-II se denomina como el elemento de respuesta dependiente de esteroides ("ERDE") ya que se requiere para promover la inducción esteroidea de la transcripción. Se une a una proteína o complejo de proteínas conocido como Chirp-I. Chirp-I se induce mediante estrógenos y rota rápidamente en presencia de ciclohexamida (Dean *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 16:2015-2024 (1996)). Los experimentos que usan un sistema de cultivo de células de glándulas tubulares definieron un juego de factores adicionales que unen ERDE de manera dependiente de esteroides, incluyendo un factor similar a NFκB (Nordstrom *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268:13193-13202 (1993); Schweers y Sanders, *J. Biol. Chem.* 266: 10490-10497 (1991)).

Se conoce menos sobre la función de HS-III y de -IV. HS-III contiene un elemento funcional de respuesta a estrógenos y confiere inducibilidad por estrógenos al promotor proximal a *ovoalbúmina* o bien al promotor heterólogo al co-transfectarse en células HeLa con un ADNc receptor de estrógeno. Estos datos implican que HS-III puede jugar un papel funcional en la regulación general del gen de la *ovoalbúmina*. Se conoce poco sobre la función de HS-IV, excepto que no contiene un elemento funcional de respuesta a estrógenos (Kato *et al.*, *Cell* 68: 731-742 (1992)).

Se ha mostrado mucho interés por la modificación de genomas eucariotas introduciendo material genético extraño y/o alterando genes específicos. Se puede probar que ciertas células eucariotas son huéspedes superiores para la producción de proteínas eucariotas exógenas. La introducción de genes que codifican ciertas proteínas también permite la creación de nuevos fenotipos que pueden incrementar el valor económico. Además, se pueden curar algunos estados de enfermedad provocados genéticamente mediante la introducción de un gen extraño que permite a las células defectivas genéticamente expresar la proteína que no se puede producir de otro modo. Finalmente, la modificación de genomas de animales mediante la inserción o la eliminación de material genético permite estudios básicos de la función de gen y, en última instancia, puede permitir la introducción de genes que se pueden usar para curar estados de enfermedad o dar como resultado la mejora en los fenotipos de animales.

La transgénesis se ha llevado a cabo en mamíferos mediante algunos procedimientos diferentes. En primer lugar, en mamíferos que incluyen el ratón, el cerdo, la cabra, la oveja y la vaca, se microinyecta un transgén en el pronúcleo de un huevo fertilizado, que se coloca entonces en el útero de una madre adoptiva en el que da lugar a un animal fundador que porta el transgén en su línea germinal. Se diseña el transgén para portar un promotor con secuencias reguladoras específicas que dirigen la expresión de la proteína extraña a un tipo de célula particular. Dado que el transgén se inserta de manera aleatoria en el genoma, los efectos de posición en el sitio de la inserción del transgén en el genoma puede provocar de manera variable la disminución de los niveles de expresión del transgén. Esta aproximación también requiere la caracterización del promotor de modo que se definan las secuencias necesarias para dirigir la expresión del transgén en el tipo de célula deseado y se incluyan en el vector del transgén (Hogan *et al.* *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1988)).

Un segundo procedimiento para efectuar la transgénesis animal es la alteración del gen dirigido, en el que un vector dirigido que lleva secuencias del gen diana que flanquean un gen marcador seleccionable se introduce en células madre embrionarias ("ME"). Por medio de recombinación homóloga, el vector dirigido reemplaza las secuencias de gen diana en el locus cromosómico o se inserta en secuencias interiores que previenen la expresión del producto de gen diana. Se seleccionan los clones de células ME que llevan el gen apropiadamente alterado y después se inyectan en blastocitos en estadio temprano que generan animales fundadores quiméricos, de los que algunos llevan el transgén en la línea germinal. En el caso en el que el transgén borre el locus diana, reemplaza el locus diana con ADN extraño presente en el vector del transgén, que consta de ADN que codifica un marcador seleccionable útil para detectar células ME transfectadas en cultivo y adicionalmente puede contener secuencias de ADN que codifican una proteína extraña que se inserta entonces en el lugar del gen borrado de modo que el promotor del gen diana conduce la expresión del gen extraño (Patente de los EE.UU. n^{os}. 5.464.764 y 5.487.992 (M.P. Capecchi y K.R. Thomas)). Esta aproximación se ve afectada por la limitación de que las células ME no están disponibles en muchos mamíferos, que incluyen cabras, vacas, ovejas y cerdos. Además, este procedimiento no es útil si se requiere el gen borrado para la supervivencia o el desarrollo apropiado del organismo o tipo celular.

Desarrollos recientes en la transgénesis aviar han permitido la modificación de genomas aviares. Se pueden producir pollos transgénicos de línea germinal inyectando el retrovirus defectivo en replicación en la cavidad subgerminal de blastodermos de polluelos en huevos recién puestos (Patente de los EE.UU. número 5.162.215; Bosselman *et al.*, *Science* 243:533-534 (1989); Thoraval *et al.*, *Transgenic Research* 4:369-36 (1995)). El ácido nucleico retroviral que porta un gen extraño se inserta aleatoriamente en un cromosoma de las células embrionarias, generando animales transgénicos, de los que algunos llevan el transgén en su línea terminal. Desafortunadamente, los vectores retrovirales no pueden albergar grandes trozos de ADN, limitando el tamaño y el número de genes extraños y de secuencias reguladoras extrañas que se pueden introducir usando este procedimiento. Además, este procedimiento no permite la introducción o la alteración dirigida de un gen por recombinación homóloga. Se ha descrito el uso de elementos aislantes insertados en la región 5' o 3' del constructo de gen fusionado para superar los efectos de posición en el sitio de inserción (Chim *et al.*, *Cell* 74:504-514 (1993)).

En otra aproximación, se ha microinyectado un transgén en el disco germinal de un huevo fertilizado para producir un ave fundadora que pasa el gen a la generación F I (Love *et al.* Bio/Technology 12:60-63 (1994)). Sin embargo, este procedimiento tiene varias desventajas. Se deben sacrificar las gallinas para recoger el huevo fertilizado, la fracción de fundadores transgénicos es baja y los huevos inyectados requieren una labor intensiva de cultivo *in vitro* en cáscaras sustitutas.

En otra aproximación, las células blastodérmicas que contienen presuntas células germinales primordiales ("CGP") se escinden de los huevos dadores, se transfectan con un transgén y se introducen en la cavidad subgerminal de los embriones receptores. Las células dadoras transfectadas se incorporan a los embriones receptores generando embriones transgénicos, de los que se espera que algunos lleven el transgén en la línea terminal. El transgén se inserta en sitios cromosómicos aleatorios mediante recombinación no homóloga. Esta aproximación requiere la caracterización del promotor de modo que se definan las secuencias necesarias para dirigir la expresión del transgén en el tipo de célula deseado y se incluyan en el vector del transgén. Sin embargo, todavía no se han generado aves fundadoras transgénicas mediante este procedimiento.

Liu *et al.* Poult Sci. 74 (supl. 1), página 11 (1995), usaron un vector dirigido que contenía secuencias de ADN flanqueantes del gen *vitelogenina* para borrar parte del gen residente en células blastodérmicas de pollo en cultivo. Sin embargo, no se ha demostrado que estas células puedan contribuir a la línea germinal y por tanto producir un embrión transgénico. Además, este procedimiento no es útil si se requiere el gen borrado para la supervivencia o el desarrollo apropiado del organismo o tipo celular.

Por tanto, se puede observar que es necesario un procedimiento para introducir ADN extraño que se una de manera operable a un promotor activo en el magno en el genoma aviar. También es necesario un procedimiento para introducir ADN extraño en porciones no esenciales de un gen diana del genoma aviar de modo que las secuencias reguladoras del gen diana conduzcan la expresión del ADN extraño, preferiblemente sin alterar la función del gen diana. También se desea la capacidad para efectuar la expresión del transgén integrado de manera selectiva dentro del oviducto aviar. Además, es necesario crear aves transgénicas modificadas en la línea germinal que expresen genes exógenos en sus oviductos y secreten las proteínas exógenas expresadas en sus huevos.

30 Sumario de la invención

Esta solicitud describe procedimientos para la introducción estable de secuencias de codificación exógenas en el genoma de un ave y la expresión de estas secuencias de codificación exógenas para producir proteínas deseadas o para alterar el fenotipo del ave. En el presente documento también se describen vectores útiles en los procedimientos, ya que son las aves transgénicas las que expresan proteína exógena y los huevos de aves que contienen proteína exógena.

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a procedimientos para producir proteínas exógenas en tejidos específicos de aves, más particularmente, en un oviducto aviar. Se introducen los transgenes en las células blastodérmicas embrionarias, preferiblemente cerca del estadio X, para producir un ave transgénica, de modo que la proteína de interés se exprese en las células de glándulas tubulares del magno del oviducto, se secreten en el lumen y se depositen sobre la yema de huevo. Un ave transgénica así producida porta el transgén en su línea germinal. Por tanto, se pueden transmitir los genes exógenos a aves tanto mediante la introducción artificial del gen exógeno en las células embrionarias del ave como mediante la transmisión del gen exógeno a la cría de ave de manera estable en forma mendeliana.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir una proteína exógena en un oviducto aviar. El procedimiento comprende en una primera etapa proporcionando un vector retroviral que contiene una secuencia de codificación y un promotor constitutivo unido de manera operable a la secuencia de codificación, de modo que el promotor puede efectuar la expresión del ácido nucleico en las células de glándulas tubulares del magno de un oviducto aviar. A continuación, se introduce el vector en células blastodérmicas embrionarias, recién aisladas en cultivo o bien en un embrión, de modo que la secuencia del vector se inserta de manera aleatoria en el genoma aviar. Finalmente, un ave transgénica madura que expresa la proteína exógena en sus células de glándulas tubulares deriva de las células blastodérmicas transgénicas. También se puede usar este procedimiento para producir un huevo de ave que contenga proteína exógena si la proteína exógena que se expresa en las células de glándulas tubulares también se secreta en el lumen del oviducto y se deposita sobre la yema de un huevo.

Se puede llevar a cabo la inserción cromosómica aleatoria y la producción de un ave transgénica mediante la transducción de las células blastodérmicas embrionarias con partículas retrovirales defectivas en replicación o competentes en replicación que portan ARN transgénico entre las LTR 5' y 3' del vector retroviral.

Se puede usar una copia de ARN del vector retroviral modificado, empaquetado en partículas víricas, para infectar blastodermos embrionarios que se desarrollan en aves transgénicas. De manera alternativa, las células auxiliares que producen las partículas de transducción retroviral se depositan en el blastodermo embrionario.

Los vectores integrados en el genoma aviar contienen promotores constitutivos que están unidos de manera operable a la secuencia de codificación exógena.

ES 2 357 495 T3

Si un promotor constitutivo está unido de manera operable a una secuencia de codificación exógena que se va a expresar en el oviducto, entonces los procedimientos de la invención también pueden implicar opcionalmente proporcionar un segundo vector que contenga una segunda secuencia de codificación y un promotor específico de magno unido de manera operable a la segunda secuencia de codificación. Este segundo vector también se expresa en las células de glándulas tubulares del ave transgénica madura. En esta realización, la expresión de la primera secuencia de codificación en el magno es directa o indirectamente dependiente de la presencia celular de la proteína expresada mediante el segundo vector. Este procedimiento puede incluir opcionalmente el uso de un sistema Cre-loxP.

También se describe en el presente documento un huevo de ave que contiene proteína exógena a la especie aviar. El uso de la invención permite la expresión de proteínas exógenas en células de oviducto con secreción de las proteínas en el lumen del magno del oviducto y deposición sobre la yema del huevo de ave. Las proteínas empaquetadas en los huevos pueden estar presentes en cantidades de hasta un gramo o más por huevo.

Otras realizaciones de la invención proporcionan para las aves transgénicas, tales como pollos o pavos, que portan un vector retroviral en el material genético de su tejido con línea germinal. El vector comprende un gen exógeno unido de manera operable a un promotor constitutivo, y el gen exógeno se expresa en el oviducto aviar del ave transgénica para producir una proteína exógena en la que la proteína exógena contiene una secuencia señal y se secreta en el lumen del oviducto de modo que la proteína se deposite en la clara de un huevo.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1(a) y 1(b) ilustran vectores de expresión del promotor de *ovoalbúmina* que comprenden segmentos del promotor de *ovoalbúmina* y una secuencia de codificación, gen X que codifica una proteína exógena X.

Las figuras 2(a), 2(b), 2(c) y 2(d) ilustran vectores retrovirales que comprenden un promotor de *ovoalbúmina* y una secuencia de codificación, gen X que codifica una proteína exógena X.

La figura 2(e) ilustra un procedimiento de amplificación de un gen exógeno para la inserción en los vectores de 2(a) y 2(b).

La figura 2(f) ilustra un vector retroviral que comprende un promotor de *ovoalbúmina* que controla la expresión de una secuencia de codificación, gen X, y un elemento de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) que permite la expresión de una segunda secuencia de codificación, gen Y.

Las figuras 3(a) y 3(b) muestran representaciones esquemáticas de los vectores derivados de ALV, pNLB y pNLB-CMV-BL, respectivamente. Se muestran ambos vectores ya que aparecerían mientras se integran en el genoma del pollo.

La figura 4 muestra una gráfica que muestra la cantidad de β -lactamasa hallada en la clara de huevo de huevos de gallinas transducidas con NLB-CMV-BL, tal como se determina mediante el ensayo de actividad de β -lactamasa.

La figura 5. muestra una transferencia de tipo Western que indica la presencia de β -lactamasa en la clara de huevo de huevos de gallinas transducidas con NLB-CMV-BL.

Las figuras 6(a) y 6(b) ilustran la expresión de gen activado por recombinación, específico de magno. En la figura 6(a) se muestran los transgenes *cre* y β -lactamasa esquemáticos integrados en el genoma de una gallina en una célula que no es de magno. En la figura 6(b) se muestran los transgenes recombinados *cre* y β -lactamasa esquemáticos integrados en el genoma de una gallina en una célula de magno.

La figura 7 ilustra un procedimiento alternativo para silenciar la expresión de β -lactamasa usando sitios loxP en los que dos sitios loxP que flanquean un codón de parada (TAA) en el marco con el primer codón (ATG) se insertan en la secuencia de codificación del péptido señal de β -lactamasa de modo que el péptido señal no se altera.

Las figuras 8(a) y 8(b) ilustran vectores dirigidos usados para la inserción de un minigen, sin promotor de la invención, en un gen diana.

La figura 9(a) ilustra un vector dirigido usado para detectar la inserción homóloga correcta de un minigen sin promotor de la invención en un gen diana.

Descripción detallada de la invención

a) Definiciones y parámetros generales

Las siguientes definiciones se exponen para ilustrar y definir el significado y el alcance de varios términos usados para describir la invención en el presente documento.

ES 2 357 495 T3

Una “secuencia de polinucleótidos o ácidos nucleicos” incluye, pero no se limita a, secuencias de ARNm eucariótico, ADNc, ADN genómico, y ADN y ARN sintético, que comprenden las bases de nucleósidos naturales adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo. La expresión también incluye secuencias que tienen una o más bases modificadas.

5 Una “secuencia de codificación” o un “marco de lectura abierto” se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos o de polinucleótidos que se pueden transcribir o traducir (en el caso de ADN) o traducir (en el caso de ARNm) en un polipéptido *in vitro* o *in vivo* si se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Las uniones de la secuencia de codificación se determinan mediante un codón de inicio de traducción en el extremo 5’ terminal (amino) y un codón de parada de traducción en el extremo 3’ terminal (carboxilo). Una secuencia de terminación de la transcripción normalmente se localizará en 3’ con respecto a la secuencia de localización. Se puede flanquear una secuencia de codificación en los extremos 5’ y/o 3’ mediante regiones no traducidas.

10 “Exón” se refiere a esa parte de un gen que, si se transcribe en un transcrito nuclear, se “expresa” en el ARNm citoplásmico después de retirar los intrones o de intervenir secuencias mediante ajuste nuclear.

15 “Secuencias reguladoras” o “secuencias de control” de ácidos nucleicos se refiere a codones de parada y de inicio traduccionales, secuencias promotoras, sitios de unión a ribosoma, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de transcripción, dominios reguladores en dirección 5’, potenciadores, y similares, según sea necesario y suficiente para la transcripción y la traducción de una secuencia de codificación dada en una célula huésped definida. Ejemplos de secuencias de control adecuadas para las células eucariotas son promotores, señales de poliadenilación y potenciadores. Es necesario que todas estas secuencias de control no estén presentes en un vector recombinante siempre que estén presentes las necesarias y suficientes para la transcripción y la traducción del gen deseado.

25 “Unido operativamente o de manera operable” se refiere a la configuración de las secuencias de control y de codificación para que se realice la función deseada. Por tanto, las secuencias de control unidas de manera operable a una secuencia de codificación pueden efectuar la expresión de la secuencia de codificación. Una secuencia de codificación se une de manera operable a o bajo el control de regiones reguladoras transcripcionales en una célula si la ADN polimerasa se une a la secuencia promotora y transcribe la secuencia de codificación en ARNm que se puede traducir en proteína codificada. Es necesario que las secuencias de control no estén contiguas a la secuencia de codificación, siempre que actúen para dirigir la expresión de la misma. Por tanto, por ejemplo, las secuencias transcritas todavía no traducidas interpuestas pueden estar presentes entre una secuencia promotora y la secuencia de codificación, y aún se puede considerar que la secuencia promotora está “unida de manera operable” a la secuencia de codificación.

30 Los términos “heterólogo” y “exógeno” ya que se refieren a secuencias de ácidos nucleicos tales como secuencias de codificación y secuencias de control, denotan secuencias que normalmente no están asociadas con una región de un constructo recombinante y/o que normalmente no están asociadas con una célula concreta. Por tanto, una región “heteróloga” de un constructo de ácido nucleico es un segmento identificable de ácido nucleico dentro de o unido a otra molécula de ácido nucleico que no se encuentra asociado a la otra molécula en la naturaleza. Por ejemplo, una región heteróloga de un constructo puede incluir una secuencia de codificación flanqueada por secuencias que no se encuentran asociadas a la secuencia de codificación en la naturaleza. Otro ejemplo de una secuencia de codificación heteróloga es un constructo en el que la secuencia de codificación por sí misma no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, secuencias sintéticas que tienen codones diferentes del gen nativo). De manera similar, una célula huésped transformada con un constructo que normalmente no está presente en la célula huésped se consideraría heteróloga para los fines de esta invención. “Gen exógeno” o “secuencia de codificación exógena” se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que no está presente de manera natural en una célula o un tejido concreto.

45 “Proteína exógena” se refiere a una proteína que no está presente de manera natural en una célula o un tejido concreto.

50 “Gen endógeno” se refiere a un gen que se produce de manera natural o a un fragmento del mismo que normalmente se asocia a una célula concreta.

55 Los productos de expresión descritos en el presente documento pueden constar de material proteínico que tiene una estructura química definida. Sin embargo, la estructura precisa depende de un número de factores, en particular de modificaciones químicas comunes de proteínas. Por ejemplo, ya que todas las proteínas contienen grupos carboxilo y amino ionizables, la proteína se puede obtener en forma de sal básica o ácida, o en forma neutra. La secuencia de aminoácidos primaria se puede derivar usando moléculas de azúcar (glucosilación) o mediante otras derivaciones químicas que implican la unión iónica o covalente con, por ejemplo, lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares, que se producen a menudo a través de la asociación con sacáridos. Estas modificaciones pueden producirse *in vitro* o *in vivo*, realizándose lo último mediante una célula huésped a través de sistemas de procesamiento postraduccional. Tales modificaciones pueden incrementar o disminuir la actividad biológica de la molécula y estas moléculas modificadas químicamente también están destinadas a entrar dentro del alcance de la invención.

65 Serán evidentes para el experto en la técnica los procedimientos alternativos de clonación, amplificación, expresión y purificación. Se dan a conocer procedimientos representativos en Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1989).

ES 2 357 495 T3

“PMGI” se refiere a la inserción de minigen sin promotor, un procedimiento en el que un gen que carece de promotor se inserta por medio de recombinación homóloga en un gen diana de modo que las secuencias reguladoras del gen diana gobiernan la expresión del gen insertado en un tejido apropiado. Un minigen es una versión modificada de un gen, a menudo sólo un ADNc con una señal de poliadenilación apropiada y a veces un intrón. Normalmente, un minigen carece de todos los intrones del gen genómico.

“Vector” significa un polinucleótido que comprende ARN o ADN súper enrollado, circular, de cadena doble o de cadena sencilla. Un vector típico puede estar comprendido por los elementos siguientes unidos de manera operativa a distancias apropiadas para permitir la expresión de gen funcional: origen de replicación, promotor, potenciador, secuencia líder de ARNm 5', sitio de unión a ribosoma, casete de ácidos nucleicos, sitios de poliadenilación y terminación, y secuencias marcadoras seleccionables. Uno o más de estos elementos se pueden omitir en aplicaciones específicas. El casete de ácidos nucleicos puede incluir un sitio de restricción para la inserción de la secuencia de ácidos nucleicos que se va a expresar. En un vector funcional el casete de ácidos nucleicos contiene la secuencia de ácidos nucleicos que se va a expresar que incluye sitios de iniciación y terminación de traducción. Se puede incluir opcionalmente un intrón en el constructo, preferiblemente ≥ 100 pb 5' de la secuencia de codificación.

En algunas realizaciones, el promotor se modificará mediante la adición o deleción de secuencias, o se reemplazará con secuencias alternativas, que incluyen secuencias sintéticas y naturales, así como secuencias que pueden ser una combinación de secuencias naturales y sintéticas. Muchos promotores eucariotas contienen dos tipos de secuencias de reconocimiento: la caja TATA y los elementos del promotor en dirección 5'. La primera, localizada en dirección 5' del sitio de iniciación de transcripción, está implicada en dirigir el ARN polimerasa para que inicie la transcripción en el sitio correcto, mientras que la última parece que determina la tasa de transcripción y está en dirección 5' de la caja TATA. Los elementos potenciadores también pueden estimular la transcripción de los promotores unidos, pero muchos actúan exclusivamente en un tipo concreto de célula. Muchos elementos promotores/potenciadores derivan de virus, por ejemplo, los promotores del CMV, del virus del sarcoma de Rous (RSV) y del SV40 son activos en un amplia variedad de tipos de células y se denominan “constitutivos” o “ubíquos”. La secuencia de ácidos nucleicos insertada en el sitio de clonación puede tener cualquier marco de lectura abierto que codifique un polipéptido de interés, con la condición de que donde la secuencia de codificación codifica un polipéptido de interés, debería carecer de sitios de ajuste críptico que puedan bloquear la producción de moléculas de ARNm apropiadas y/o producir moléculas de ARNm anormales o ajustadas de manera anómala.

La región de terminación que se emplea principalmente será una de conveniencia, ya que parece que las regiones de terminación son relativamente intercambiables. La región de terminación puede ser nativa a la secuencia de ácidos nucleicos deseada de interés o puede derivarse de otra fuente.

Se construye un vector de modo que la secuencia de codificación concreta esté localizada en el vector con las secuencias reguladoras apropiadas, la posición y la orientación de la secuencia de codificación con respecto a las secuencias de control están de modo que la secuencia de codificación se transcribe bajo el “control” de las secuencias reguladoras o de control. Puede que sea deseable la modificación de las secuencias que codifican la proteína concreta de interés para lograr este fin: Por ejemplo, en algunos casos puede que sea necesario modificar la secuencia de modo que se pueda unir a las secuencias de control con la orientación apropiada; o mantener el marco de lectura. Las secuencias de control y otras secuencias reguladoras se pueden ligar a la secuencia de codificación antes de la inserción en un vector. De manera alternativa, se puede clonar directamente la secuencia de codificación en un vector de expresión que ya contenga las secuencias de control y un sitio de restricción apropiado que esté en el marco de lectura con y bajo el control regulador de las secuencias de control.

Un “gen marcador” es un gen que codifica una proteína que permite la identificación y el aislamiento de células correctamente transfectadas. Secuencias de marcadores adecuados incluyen, pero sin limitarse a genes de proteína *fluorescente verde*, *amarilla* y *azul* (*GFP*, *YFP* y *BFP*, respectivamente). Otros marcadores adecuados incluyen genes de *timidina quinasa* (*tk*), *dihidrofolato reductasa* (*DHFR*) y *aminoglucósido fosfotransferasa* (*APH*). El último imparte resistencia a los antibióticos aminoglucósidos, tales como kanamicina, neomicina y geneticina. Estos y otros genes marcadores tales como los que codifican cloranfenicol acetiltransferasa (*CAT*), β -lactamasa, β -galactosidasa (β -gal), se pueden incorporar en el casete de ácido nucleico primario junto con el gen que expresa la proteína deseada o los marcadores de selección pueden estar contenidos en vectores separados y cotransfectarse.

Un “gen indicador” es un gen marcador que “indica” su actividad en una célula mediante la presencia de la proteína que codifica.

Una “partícula retroviral” o “partícula de transducción” se refiere a un virus competente en replicación o defectivo en replicación que puede transducir ARN o ADN no vírico en una célula.

Los términos “transformación”, “transducción” y “transfección” denotan todos la introducción de un polinucleótido en una célula blastodérmica aviar.

“Magno” es esa parte del oviducto entre el infundíbulo y el istmo que contiene células de glándulas tubulares que sintetizan y secretan las proteínas de la clara de huevo del huevo.

ES 2 357 495 T3

Un promotor “específico de magno”, tal como se usa en el presente documento, es un promotor que es activo de manera principal o exclusivamente en las células de glándulas tubulares del magno.

b) *Transgénesis de células blastodérmicas*

5 Mediante los procedimientos de la presente invención, se pueden introducir los transgenes en células blastodérmicas aviares, para producir un pollo transgénico u otras especies aviares, que porta el transgén en el material genético o en su tejido de línea germinal. Las células blastodérmicas son normalmente células en los estadios VII-XII, o el equivalente de los mismos, y están preferiblemente próximas al estadio X. Las células útiles en la presente invención incluyen células germinales embrionarias (GE), células madre embrionarias (ME) & células germinales primordiales (CGP). Las células embrionarias blastodérmicas pueden estar recién aisladas, mantenerse en cultivo o residir dentro de un embrión.

15 En el presente documento se describe una variedad de vectores útiles en llevar a cabo los procedimientos de la presente invención. Estos vectores se pueden usar para producir proteínas exógenas en el oviducto de un ave. Aún en realizaciones adicionales, se usan los vectores en procedimientos para producir huevos de ave que contengan proteína exógena.

20 En algunos casos, la introducción de un vector de la presente invención en las células blastodérmicas embrionarias se lleva a cabo con células blastodérmicas embrionarias que están recién aisladas o bien en cultivo. Entonces, se inyectan normalmente las células transgénicas en la cavidad subgerminal bajo un blastodermo receptor en un huevo. En algunos casos, sin embargo, se deposita el vector directamente en las células de un embrión blastodérmico.

25 Un vector descrito en el presente documento contiene una secuencia de codificación y un promotor específico de magno en relación posicional y operacional para expresar la secuencia de codificación en la célula de glándulas tubulares del magno del oviducto aviar. El promotor específico de magno puede ser opcionalmente un segmento de la región del promotor de *ovoalbúmina* que es suficientemente grande para dirigir la expresión de la secuencia de codificación en las células de glándulas tubulares.

30 Las figuras 1(a) y 1(b) ilustran ejemplos de vectores de expresión del promotor de *ovoalbúmina*. El gen X es una secuencia de codificación que codifica una proteína exógena. Las flechas dobladas indican los sitios de inicio transcripcional. En un ejemplo, el vector contiene 1,4 kb de una región flanqueante 5' del gen de *ovoalbúmina* (figura 1(a)). La secuencia del “promotor -1,4 kb” de la figura 1(a) corresponde a la secuencia que se inicia desde aproximadamente 1,4 kb en dirección 5' (-1,4 kb) del sitio de inicio de transcripción de *ovoalbúmina* y que se extiende aproximadamente 9 residuos en la región no traducida 5' del gen de *ovoalbúmina*. El segmento de aproximadamente 1,4 kb de longitud alberga dos elementos reguladores críticos, el elemento regulador dependiente de esteroides (ERDE) y el elemento regulador negativo (ERN). El ERN se llama así debido a contiene varios elementos reguladores negativos que bloquean la expresión del gen en ausencia de hormona. Un segmento de 0,88 kb más corto también contiene ambos elementos. 35 En otro ejemplo, el vector contiene aproximadamente 7,4 kb de la región flanqueante 5' del gen de *ovoalbúmina* y alberga dos elementos adicionales (HS-III y HS-IV), de los que se sabe que uno contiene una región funcional que permite la inducción del gen mediante estrógeno (figura 1(b)). Un segmento de 6 kb más corto también contiene los cuatro elementos y se puede usar opcionalmente.

45 Cada vector usado para la integración aleatoria comprende preferiblemente al menos un elemento de 1,2 kb del locus de β -globina de pollo que aísla el gen en el interior tanto de la activación como de la inactivación en el sitio de inserción en el genoma. Se pueden añadir dos elementos aislantes a un extremo del constructo del gen de *ovoalbúmina*. En el locus de la β -globina, los elementos aislantes sirven para prevenir la región de control del locus distal (RCL) de la activación de genes en dirección 5' del dominio de gen de la globina, y se ha observado que supera los efectos de posición en moscas transgénicas, indicando que pueden proteger contra efectos tanto negativos como positivos en el sitio de inserción. El/los elemento(s) aislante(s) sólo se necesita(n) en el extremo 5' o bien en el extremo 3' del gen ya que los transgenes están integrados en copias en tándem múltiples creando de manera efectiva una serie de genes flanqueados mediante el aislante del transgén contiguo. En otra realización, el elemento aislante no está unido al vector pero se cotransfecta con el vector. En este caso, el vector y el elemento se unen en tándem en la célula mediante el procedimiento de integración aleatoria en el genoma. 50 55

Opcionalmente, cada vector también puede comprender un gen marcador para permitir la identificación y el enriquecimiento de clones de células que han integrado de manera estable el vector de expresión. Se conduce la expresión del gen marcador mediante un promotor ubicuo que conduce altos niveles de expresión en varios tipos de células. En una realización preferida se conduce el gen indicador de *proteína fluorescente verde (GFP)* (Zoiotukhin *et al.*, J. Virol 70:4646-4654 (1995)) mediante el promotor del *factor de elongación 1- α (ef-1 α)* de *Xenopus* (Johnson y Krieg, Gene 147:223-26 (1994)). El promotor del *ef-1 α* de *Xenopus* es un promotor fuerte expresado en varios tipos de células. La *GFP* contiene mutaciones que potencian su fluorescencia y está humanizada o modificada de modo que los codones se corresponden con el perfil de uso de codones de los genes humanos. Ya que, virtualmente, el uso de codones aviares es el mismo que el uso de codones humanos, la forma humanizada del gen también se expresa sumamente en células blastodérmicas aviares. En realizaciones alternativas, el gen marcador se une de manera operable a uno de los promotores ubicuos de *HSV tk*, *CMV* o β -*actina*. 60 65

ES 2 357 495 T3

Mientras que el uso de codones aviares se corresponde bien, si se usa un gen de invertebrado como secuencia de codificación en el transgén, se puede modificar una secuencia de invertebrado para cambiar los codones apropiados de modo que el uso de codones sea similar al de humanos y aves.

5 Se puede mediar la transfección de las células blastodérmicas por cualquiera de los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. En la presente invención, la introducción del vector en las células blastodérmicas embrionarias está mediada por retrovirus.

10 En un procedimiento de transfección de células blastodérmicas, se usa un vector basado en retrovirus empaquetado para depositar el vector en células blastodérmicas embrionarias de modo que el vector se integra en el genoma aviar.

Como alternativa al depósito de partículas de transducción retrovirales en células blastodérmicas embrionarias en un embrión, se pueden depositar células auxiliares que producen el retrovirus en el blastodermo.

15 Un retrovirus preferido para introducir de manera aleatoria un transgén en el genoma aviar es el retrovirus ALV deficiente en replicación.

Cualquiera de los vectores de la presente invención también puede incluir opcionalmente una secuencia de codificación que codifique un péptido señal que dirigirá la secreción de la proteína expresada mediante la secuencia de codificación del vector desde las células de glándulas tubulares del oviducto. Este aspecto de la invención amplía de manera efectiva el espectro de proteínas exógenas que se pueden depositar en los huevos aviares usando los procedimientos de la invención. Si no se pudiera secretar de otro modo una proteína exógena, se modifica el vector que lleva la secuencia de codificación para comprender una secuencia de ADN que comprenda aproximadamente 60 pb que codifiquen un péptido señal desde el gen de la lisozima. Se inserta la secuencia de ADN que codifica el péptido señal en el vector de modo que esté localizada en el extremo N terminal de la proteína codificada por el ADNc.

20 Las figuras 2(a)-2(d) y 2(f) ilustran ejemplos de vectores retrovirales. Se inserta el vector en el genoma aviar con las LTR flanqueantes 5' y 3'. *Neo* es el gen *neomicina fosfotransferasa*. Las flechas dobladas indican sitios de inicio de transcripción. Las figuras 2(a) y 2(b) ilustran transcritos de oviducto y LTR con una secuencia que codifica el péptido señal de lisozima (LSP), mientras que las figuras 2(c) y 2(d) ilustran transcritos sin esta secuencia. Hay dos partes de la estrategia con vectores retrovirales. Cualquier proteína que contenga un péptido señal eucariota se puede clonar en los vectores representados en las figuras 2(b) y 2(d). Cualquier proteína que no se secreta de manera ordinaria se puede clonar en los vectores representados en las figuras 2(a) y 2(b) para permitir su secreción desde las células de glándulas tubulares.

30 La figura 2(e) ilustra la estrategia para clonar un gen exógeno en un vector del péptido señal de la *lisozima*. Se usa la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar una copia de la secuencia de codificación, gen *X*, usando un par de cebadores oligonucleótidos que contienen sitios de enzimas de restricción que permiten la inserción del gen amplificado en el plásmido después de la digestión con las dos enzimas. Los oligonucleótidos 5' y 3' contienen los sitios de restricción *Bsu361* y *Xba1*, respectivamente.

Otro aspecto de la invención implica el uso de elementos de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) en cualquiera de los vectores de la presente invención para permitir la traducción de dos o más proteínas desde el ARNm di- o policistrónico. Las unidades de IRES se fusionan a los extremos 5' de una o más secuencias de codificación adicionales que, entonces, se insertan en los vectores en el extremo de la secuencia de codificación original, de modo que las secuencias de codificación están separadas entre sí por un IRES. De acuerdo con este aspecto de la invención, se facilita la modificación postraduccional del producto ya que una secuencia de modificación puede codificar una enzima que puede modificar el otro producto de secuencia de modificación. Por ejemplo, la primera secuencia de modificación puede codificar colágeno que estaría hidroxilado y activado por la enzima codificada por la secuencia de modificación.

55 Para ilustración, en el ejemplo de vector retroviral vector de la figura 2(f), un elemento de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) se posiciona entre dos secuencias de codificación exógenas (gen *X* y gen *Y*). El IRES permite que tanto la proteína *X* como la proteína *Y* se traduzcan a partir del mismo transcrito dirigido por el promotor de *ovoalbúmina*. Las flechas dobladas indican los sitios de inicio transcripcional. Se espera que la expresión de la proteína codificada por el gen *X* sea la más alta en las células de glándulas tubulares, en las que se expresa específicamente pero no se secreta. La proteína codificada por el gen *Y* también se expresa específicamente en las células de glándulas tubulares pero debido a que se secreta de manera efectiva, la proteína *Y* se empaqueta en los huevos.

60 En otro aspecto de la invención, las secuencias de codificación de los vectores usados en muchos de los procedimientos de la presente invención están provistas de una región no traducida 3' (RNT 3') para conferir estabilidad al ARN producido. Para ilustración, si se añade una RNT 3' a un vector retroviral, la orientación del promotor de *ovoalbúmina* fusionado, el gen *X*, y de la RNT 3' debe estar invertida en el constructo, de modo que la adición de la RNT 3' no interferirá con la transcripción del ARN genómico de longitud completa. En una realización preferida actualmente, la RNT 3' puede ser la de los genes de *ovoalbúmina* o *lisozima*, o cualquier RNT 3' que sea funcional en una célula de magno, es decir, la región final de SV40.

En la presente invención, se usa un promotor constitutivo para expresar la secuencia de codificación de un transgén en el magno de un ave. En este caso, la expresión no se limita sólo al magno, también se produce expresión en otros tejidos dentro del ave. Sin embargo, el uso de este transgén todavía es adecuado para efectuar la expresión de una proteína en el oviducto y la posterior secreción de la proteína en la clara de huevo, si la proteína no es tóxica para el ave en la que se expresa.

La figura 3(a) muestra un esquema del vector basado en el virus de la leucosis aviar (VLA) deficiente en replicación, pNLB, un vector que es adecuado para su uso en esta realización de la invención. En el vector pNLB, la mayoría del genoma del VLA se reemplaza por el gen de resistencia a neomicina (*Neo*) y el gen *lacZ*, que codifica la b-galactosidasa. La figura 3(b) muestra el vector pNLB-CMV-BL, en el que se ha reemplazado el *lacZ* por el promotor del CMV y la secuencia de codificación de β -lactamasa (β -La o BL). Se indica la construcción del vector en el ejemplo específico, ejemplo 1, a continuación. La β -lactamasa se expresa a partir del promotor del CMV y utiliza una señal de poliadenilación (pA) en la repetición terminal larga 3' (LTR). La β -lactamasa tiene un péptido señal natural; por tanto, se encuentra en la sangre y en la clara de huevo.

Los embriones de ave se han traducido exitosamente con partículas de transducción de pNLB-CMV-BL (véanse los ejemplos específicos, ejemplos 2 y 3, a continuación). Se ha encontrado que las claras de huevo de huevos de gallinas transducidas de manera estable resultantes contienen hasta 20 mg de β -lactamasa activa, secretada por huevo (véanse los ejemplos específicos, ejemplos 4 y 5, a continuación).

En una realización alternativa de la invención, se usan los transgenes que contienen promotores constitutivos, pero los transgenes están diseñados de modo que la expresión del transgén se vuelva de manera efectiva específico para magno. Por tanto, un procedimiento para producir una proteína exógena en un oviducto aviar proporcionado por la presente invención implica generar un ave transgénica que lleve dos transgenes en sus células glandulares tubulares. Un transgén comprende una primera secuencia de codificación unida de manera operable a un promotor constitutivo. El segundo transgén comprende una segunda secuencia de codificación que está unida de manera operable a un promotor específico de magno, en el que la expresión de la primera secuencia de codificación es dependiente directa o bien indirectamente de la presencia celular de la proteína expresada mediante la segunda secuencia de codificación.

Opcionalmente, se utilizan sistemas de recombinación específicos de sitio, tales como los sistemas Cre-*loxP* o FLP-FRT, para implementar la activación específica de magno de un promotor constitutivo diseñado. En una realización, el primer transgén contiene una secuencia de bloqueo unida a FRT que bloquea la expresión de la primera secuencia de codificación en ausencia de FTP, y la segunda secuencia de codificación codifica FTP. En otra realización, el primer transgén contiene una secuencia de bloqueo unida a *loxP* que bloquea la expresión de la primera secuencia de codificación en ausencia de la enzima Cre, y la segunda secuencia de codificación codifica Cre. La secuencia de bloqueo unida a *loxP* puede estar posicionada en la región no traducida 5' de la primera secuencia de codificación y la secuencia unida a *loxP* puede contener opcionalmente un marco de lectura abierto.

Por ejemplo, en una realización de la invención, la expresión específica de magno se confiere en un transgén constitutivo, uniendo un promotor del citomegalovirus (CMV) a la secuencia de codificación de la proteína que se secreta (CDS) (figuras 6(a) y 6(b)). La región no traducida 5' (RNT) de la secuencia de codificación contiene una secuencia de bloqueo unida a *loxP*. La secuencia de bloqueo unida a *loxP* contiene dos sitios *loxP*, entre los que está un codón de inicio (ATG) seguido de un codón de parada, creando un marco de lectura abierto sin sentido, corto (ORF). Nótese que la secuencia *loxP* contiene dos codones de inicio en la misma orientación. Por lo tanto, para prevenir que interfieran con la traducción de la secuencia de codificación después de la escisión de *loxP*, los sitios *loxP* se deben orientar de modo que los ATG estén en la cadena opuesta.

En ausencia de enzima Cre, el promotor de citomegalovirus conduce la expresión del marco de lectura abierto pequeño (ORF) (figura 6(a)). Los ribosomas iniciarán en el primer ATG, el codón de inicio del ORF, entonces, terminarán sin poder reiniciar la traducción en el codón de inicio de la secuencia de codificación. Para asegurarse que la secuencia de codificación no se traduce, el primer ATG está fuera del marco con el ATG de la secuencia de codificación. Si la enzima Cre se expresa en células que contienen el transgén CMV-ADNc, la enzima Cre recombinará los sitios *loxP*, escindiendo el ORF interpuesto (figura 6(b)). Ahora la traducción comenzará en el codón de inicio de la secuencia de codificación, dando como resultado la síntesis de la proteína deseada.

Para hacer que este sistema sea específico de tejido, se expresa la enzima Cre bajo el control de un promotor específico de tejido, tal como el promotor de *ovoalbúmina* específico de magno, en la misma célula que el transgén de secuencia de codificación CMV-*loxP* (figura 6(b)). Aunque un promotor de *ovoalbúmina* truncado puede ser bastante débil, aún es específico de tejido y expresará cantidades de la enzima Cre suficientes para inducir la escisión eficiente del ORF de interferencia. De hecho, unos niveles de recombinasa bajos deberían permitir la expresión más alta de la proteína recombinante ya que no compite contra los transcritos de la secuencia de codificación para la maquinaria de traducción.

Los procedimientos alternativos de traducción de bloqueo de la secuencia de codificación incluyen la inserción de una señal de terminación de la transcripción y/o una señal de ajuste entre los sitios *loxP*. Se pueden insertar éstas junto con el ORF de bloqueo o solas. En otra realización de la invención, se puede insertar un codón de parada entre los sitios *loxP* en el péptido señal de la secuencia de codificación (véase la figura 7). Antes de que se exprese la recombinasa, el péptido termina antes de la secuencia de codificación. Después de que se exprese la recombinasa

(bajo la dirección de un promotor específico de tejido), se escinde el codón de parada, permitiendo la traducción de la secuencia de codificación. El sitio *loxP* y la secuencia de codificación están yuxtapuestos de modo que están en el marco y los codones de parada de *loxP* están fuera del marco. Debido a que los péptidos señal pueden aceptar la secuencia adicional (Brown *et al.*, Mol. Gen. Genet. 197:351-7 (1984)), es improbable que la inserción de *loxP* u otras secuencias diana de recombinasa (es decir, FRT) interfiera con la secreción de la secuencia de codificación deseada. En el vector de expresión que se muestra en la figura 7, el sitio *loxP* está presente en el péptido señal de modo que los aminoácidos codificados por *loxP* no están presentes en la proteína secretada, madura. Antes de que se exprese la enzima Cre, la traducción termina en el codón de parada, previniendo la expresión de la β -lactamasa. Después de que se expresa la recombinasa (sólo en células de magno), los sitios *loxP* recombinan y escinden el primer codón de parada. Por lo tanto, la β -lactamasa se expresa de manera selectiva sólo en células de magno.

En las realizaciones mencionadas anteriormente, el ORF de bloqueo puede ser cualquier péptido que no sea dañino para los pollos. El ORF de bloqueo también puede ser un gen que sea útil para la producción de las partículas de transducción de ALV y/o de las aves transgénicas. En una realización, el ORF de bloqueo es un gen marcador.

Por ejemplo, el ORF de bloqueo podría ser el gen de resistencia a neomicina, que se requiere para la producción de las partículas de transducción. Una vez se integra el transgén en el genoma del pollo, no se requiere el gen de resistencia a neomicina y se puede escindir.

Alternativamente, se puede usar la β -lactamasa como ORF de bloqueo ya que es un marcador útil para la producción de aves transgénicas. (Para ejemplos específicos del uso de la β -lactamasa como marcador en aves transgénicas, véase el ejemplo 4, a continuación). Como ejemplo, el ORF de bloqueo en la figura 6(a) se reemplaza por la β -lactamasa y la secuencia de codificación en dirección 3' codifica ahora un fármaco biológico secretado. La β -lactamasa se expresará en la sangre y otros tejidos; no se expresará en el magno después de la expresión específica de magno de Cre y de la escisión mediada de recombinación de la β -lactamasa, permitiendo la expresión de la proteína deseada.

Se podrían insertar los transgenes Cre y *loxP* en el genoma del pollo por medio de transgénesis mediada simultáneamente o de manera separada. Es adecuado cualquier procedimiento de transgénesis que dé como resultado la integración estable en el genoma del pollo. Se pueden colocar simultáneamente en pollos tanto el transgén de recombinasa promotor de *ovoalbúmina* como el transgén CMV-*loxP*-CDS. Sin embargo, la eficacia de la transgénesis es baja y por tanto, la eficacia de conseguir ambos transgenes en el genoma del pollo de manera simultánea es baja. En un procedimiento preferido y alternativo, se produce una bandada que porta el transgén de recombinasa promotor específico de magno y se produce una segunda que porta el transgén CMV-*loxP*-CDS. Entonces, las bandadas se cruzarían entre sí. Las gallinas que resultan de esta exogamia expresarán la secuencia de codificación únicamente en su magno.

Tal como se menciona anteriormente, los vectores producidos de acuerdo con los procedimientos de la invención pueden estar provistos opcionalmente de una RNT 3' que contiene un sitio de poliadenilación para conferir estabilidad al ARN producido. En una realización preferida, la RNO 3' puede ser la del gen exógeno o puede seleccionarse del grupo que consta de la región final de *SV40*, *lisozima* u *ovoalbúmina*.

c) Producción de proteína exógena

Los procedimientos de la invención que proporcionan la producción de proteína exógena en el oviducto aviar y la producción de huevos que contienen proteína exógena implican una etapa adicional posterior a proporcionar un vector apropiado e introducir el vector en células blastodérmicas embrionarias de modo que se integra el vector en el genoma aviar. La etapa posterior implica la derivación de un ave transgénica madura a partir de células blastodérmicas transgénicas producidas en las etapas previas. La derivación de un ave transgénica madura a partir de células blastodérmicas implica opcionalmente transferir las células blastodérmicas transgénicas a un embrión y permitir que se desarrolle completamente este embrión, de modo que las células llegan a incorporarse en el ave mientras que se permite que el embrión se desarrolle. Entonces, se deja que el polluelo resultante crezca hasta su madurez. En una realización alternativa, se transfectan las células de un embrión blastodérmico o se transducen con el vector directamente dentro del embrión. Se permite que el embrión resultante se desarrolle y se permite que el polluelo madure.

En ambos casos, el ave transgénica así producida a partir de las células blastodérmicas transgénicas se conoce como fundadora. Algunos fundadores portarán el transgén en las células de glándulas tubulares en el magno de sus oviductos. Estas aves expresarán la proteína exógena codificada por el transgén en sus oviductos. Si la proteína exógena contiene las secuencias señales apropiadas, se secretará en el lumen del oviducto en sobre la yema de un huevo.

Algunos fundadores son fundadores de línea germinal. Un fundador de línea germinal es un fundador que porta el transgén en el material genético de su tejido de línea germinal, y también puede portar el transgén en las células de glándulas tubulares de magno del oviducto que expresan la proteína exógena. Por lo tanto, de acuerdo con la invención, el ave transgénica tendrá células de glándulas tubulares que expresen la proteína exógena y la cría del ave transgénica también tendrá células de glándulas tubulares de magno del oviducto que expresen la proteína exógena. (Alternativamente, la cría expresa un fenotipo determinado por la expresión del gen exógeno en un tejido específico del ave).

ES 2 357 495 T3

Se puede usar la invención para expresar, con grandes rendimientos y bajo coste, un amplio intervalo de proteínas deseadas que incluyen las usadas como fármacos para animales y humanos, diagnósticos y aditivos de pienso para ganado. Proteínas tales como la hormona de crecimiento humano, interferón, lisozima y β -caseína son ejemplos de proteínas que se expresan de manera deseable en el oviducto y que se depositan en los huevos de acuerdo con la invención. Otras proteínas posibles para que se produzcan incluyen, pero sin limitarse a, albúmina, α -1 antitripsina, antitrombina III, colágeno, factores VIII, IX, X (y similares), fibrinógeno, ácido hialurónico, insulina, lactoferrina, proteína C, eritropoyetina (EPO), factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de estimulación de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), activador de plasminógeno de tipo de tejido (tPA), enzimas aditivas de alimentación, somatotropina y quimotripsina. También se pueden expresar para su uso como fármacos o diagnóstico, los anticuerpos modificados genéticamente, tales como inmunotoxinas que se unen a la superficie de los antígenos en las células de tumores humanos y los destruyen.

d) Ejemplos

Se pretende que los ejemplos específicos siguientes ilustren la invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo 1

20 Construcción del vector

Se reemplazó el gen *lacZ* de pNLB, un vector basado en el virus de leucosis aviar (ALV) deficiente en replicación (Cosset *et al.*, 1991), con un casete de expresión que consistía en un promotor del citomegalovirus (CMV) y el gen indicador, β -lactamasa (β -La o BL). Los constructos de los vectores pNLB y pNLB-CMV-BL se muestran en los diagramas de las figuras 3(a) y 3(b), respectivamente.

Para reemplazar eficazmente el gen *lacZ* de pNLB con un transgén, se creó primero un plásmido adaptador intermedio, adaptador-pNLB. Se creó el adaptador-pNLB insertando el fragmento que ha vuelto a tratarse de *ApaI/ApaI* de pNLB (Cosset *et al.*, J. Virol. 65:3388-94 (1991)) (en el pNLB, el *ApaI* 5' reside a 289 pb en dirección 5' a *lacZ* y el *ApaI* 3' reside 3' de la RNT 3' y los segmentos Gag) en los sitios que han vuelto a tratarse de *KpnI/SacI* de pBluescriptKS(-). Se insertó el fragmento de *MluI/XbaI* lleno de pCMV-BL (Moore *et al.*, Anal. Biochem. 247: 203-9 (1997)) en los sitios que han vuelto a tratarse de *KpnI/NdeI* del adaptador-pNLB, reemplazando *lacZ* con el promotor del CMV y el gen BL (en pNLB, *KpnI* reside a 67 pb en dirección 5' de *lacZ* y *NdeI* reside a 100 pb en dirección 5' del codón de parada *lacZ*), creando por tanto el adaptador-pNLB-CMV-BL. Para crear el pNLB-CMV-BL, se reemplazó el inserto de *HindIII/BspI* de pNLB (que contenía *lacZ*) con el inserto de *HindIII/BspI* de adaptador-pNLB-CMV-BL. Fue necesario esta clonación de dos etapas ya que la ligación directa de los fragmentos de extremos romos en los sitios *HindIII/BspI* de pNLB proporcionaron subclones mayoritariamente reordenados, por razones desconocidas.

Ejemplo 2

40 Producción de partículas de transducción

Se cultivaron Sentas e Isoldes en F10 (Gibco), suero de ternero recién nacido al 5% (Gibco), suero de pollo al 1% (Gibco), 50 μ g/ml de fleomicina (Cayla Laboratories) y 50 μ g/ml de higromicina (Sigma). Se produjeron partículas de transducción tal como se describe en Cosset *et al.*, 1993 con las excepciones siguientes. Dos días después de la transfección del vector retroviral pNLB-CMV-BL (del ejemplo 1, anterior) en 9×10^5 Sentas, se recogió el virus en medio fresco durante 6-16 horas y se filtró. Se usó todo el medio para transducir 3×10^6 Isoldes en 3 placas de 100 mm con polibreno añadido hasta una concentración final de 4 μ g/ml. Al día siguiente se reemplazó el medio con medio que contenía 50 μ g/ml de fleomicina, 50 μ g/ml de higromicina y 200 μ g/ml de G418 (Sigma). Después de 10-12 días, se aislaron colonias de G418^r solas y se transfirieron a placas de 24 pocillos. Después de 7-10 días, se determinaron las valoraciones de cada colonia mediante transducción de Sentas seguido de selección de G418. Normalmente 2 de cada 60 colonias dieron valoraciones a $1-3 \times 10^5$. Se expandieron esas colonias y se concentró el virus hasta $2-7 \times 10^7$ tal como se describió en Allioli *et al.*, Dev. Biol. 165:30-7 (1994). Se confirmó la integridad del casete de expresión de CMV-BL ensayando para β -lactamasa en el medio de células transducidas con partículas de transducción NLB-CMV-BL.

Ejemplo 3

60 Producción de pollos transgénicos

Se transdujeron embriones en estadio X en huevos recién puestos con partículas de transducción NLB-CMV-BL (del ejemplo 2, anterior) tal como se describe en Thoraval *et al.*, Transgenic Res. 4:369-377 (1995), incorporado a continuación en el presente documento por referencia, excepto porque se recubrió el agujero de la cáscara de huevo con 1-2 capas de membrana de cáscara de huevo y, una vez seca, con cemento de modelo Duco.

Se produjeron aproximadamente 120 White Leghorns mediante transducción de los embriones en estadio X con partículas de transducción NLB-CMV-BL. Estas aves constituyeron los fundadores quiméricos, aves no completamente transgénicas. Un análisis extensivo de ADN de la sangre y del esperma de los pollos transducidos indica que

sólo el 10-20% tenía niveles detectables del transgén en cualquier tejido dado. De esas aves, sólo el 2-15% de las células en cualquier tejido dado eran realmente transgénicas.

Ejemplo 4

5

Ensayo de actividad de β -lactamasa en sangre y clara de huevo

Cuando las gallinas producidas en el ejemplo 3, anterior, comenzaron a poner huevos, se sometieron a ensayo las claras de huevo de esos huevos para determinar la presencia de β -lactamasa. Se llevó a cabo el ensayo de β -lactamasa tal como se describe en Moore *et al.*, Anal. Biochem. 247:203-9 (1997), incorporado a continuación en el presente documento por referencia, con las modificaciones siguientes.

Para someter a ensayo la sangre de polluelos de dos a diez días de edad, se pinchó la vena de la pata con un bisturí. Se recogieron 50 μ l de sangre en un tubo capilar heparinizado (Fisher), de los que se transfirieron 25 μ l a 100 μ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS) en una placa de 96 pocillos. Se añadieron varias diluciones de β -lactamasa purificada (Calbiochem) a algunos pocillos antes de la adición de la sangre de los polluelos de control (no transducidos) para establecer una curva estándar de β -lactamasa. Después de un día a 4°C, se centrifugó la placa durante 10 minutos a 730 x g. Se añadieron 25 μ l del sobrenadante a 75 μ l de PBS. Se añadieron 100 μ l de ácido 7-(tienil-2-acetamido)-3-[2-(4-N,N-dimetilaminofenilazo)piridinio-metil]-3-cefem-4-carboxílico 20 μ M (PADAC, de Calbiochem) en PBS, y se leyeron inmediatamente los pocillos sobre un lector de placas en una lectura cinética de 10 minutos a 560 nm o se dejaron toda la noche a oscuras a temperatura ambiente. Se valoraron como positivos los pocillos si el pocillo cambiaba de púrpura a amarillo. Para someter a ensayo la sangre de otras aves, se siguió el mismo procedimiento excepto porque se sacaron 200-300 μ l de sangre de la vena del ala usando una jeringuilla preparada con 50 μ l de heparina (Sigma).

25

El análisis de la bandada transducida con NLB-CMV-BL reveló nueve pollos que tenían niveles significativos de β -lactamasa en su sangre. Tres de estos pollos eran machos y éstos eran los únicos tres machos que tenían niveles significativos del transgén NLB-CMV-BL en su esperma tal como se determinó mediante análisis por PCR (véase el ejemplo 10, a continuación). Por tanto, éstos son los machos con los que hay que criar de manera exogámica para obtener crías G₁ completamente transgénicas. Los otros seis pollos eran las gallinas que expresaron β -lactamasa en el tejido de su magno (véase a continuación). Otras aves tenían niveles bajos de β -lactamasa (justo por encima del nivel de detección) en su sangre pero no tenían huevos ni esperma transgénico que contuviera β -lactamasa. Por tanto, la expresión de β -lactamasa en sangre es un fuerte indicador de si un pollo se transdujo exitosamente.

35

Para someter a ensayo la β -lactamasa en la clara de huevo, se transfirieron huevos recién puestos ese día a un refrigerador a 4°C, punto en el que la β -lactamasa es estable durante al menos un mes. (Se determinó la β -lactamasa purificada, expresada bacteriamente expresada añadida a la clara de huevo para la pérdida de actividad mínima durante varias semanas a 4°C, limitando la estabilidad de la β -lactamasa en la clara de huevo). Para recoger muestras de clara de huevo, se rompieron los huevos sobre una envoltura de plástico. Se pipeteó la clara de huevo arriba y abajo varias veces para mezclar las claras de huevo gruesa y fina. Se transfirió una muestra de clara de huevo a una placa de 96 pocillos. Se transfirieron 10 μ l de la muestra de clara de huevo a una placa de 96 pocillos que contenía 100 μ l de PBS complementado con 1,5 μ l de NaH₂PO₄ 1 M, pH 5,5 por pocillo. Después de la adición de 100 μ l de PADAC 20 μ M, se leyeron inmediatamente los pocillos sobre un lector de placas en una lectura cinética de 10 minutos o de 12 horas a 560 nm. Se añadieron varias diluciones de β -lactamasa purificada a algunos pocillos junto con 10 μ l de clara de huevo de las gallinas de control (no transducidos) para establecer una curva estándar de β -lactamasa. Se sometieron a ensayo las claras de huevo tanto de gallinas transducidas con NLB-CMV-BL como no tratadas para determinar la presencia de β -lactamasa.

50

Se detectaron niveles significativos de β -lactamasa en la clara de huevo de cinco gallinas, tal como se muestra en la figura 4 y en la tabla 1, a continuación. Los huevos puestos por la gallina 1522 ("Betty Lu"), la primera gallina que demuestra expresión en huevos, tienen 0,3 mg o más de β -lactamasa activa por huevo. También se muestra que la producción de β -lactamasa de otras tres gallinas transducidas con NLB-CMV-BL (gallina 1549, gallina 1790 y gallina 1593). Cada gallina que puso huevos que contenían β -lactamasa también tenía niveles significativos de β -lactamasa en su sangre.

55

Basándose en ensayo de actividad de β -lactamasa, los niveles de expresión de β -lactamasa parece que varían desde 0,1 hasta 1.3 mg por huevo (asumiendo 40 mililitros de clara de huevo por huevo). Sin embargo, estas cantidades eran significativamente inferiores a las cantidades obtenidas mediante el ensayo de transferencia de tipo Western (véase el ejemplo 5, a continuación) y se determinó que eran falsamente inferiores a los valores verdaderos. Se encontró que la diferencia de resultados entre el ensayo de actividad enzimática y el análisis de transferencia de tipo Western (ejemplo 5) era debida a la presencia de un inhibidor de la β -lactamasa en la clara de huevo. Se mostró que la actividad de la β -lactamasa purificada se inhibía mediante la clara de huevo de modo que 50 ml de clara de huevo en una reacción de 200 ml daba como resultado una inhibición de casi el 100%, mientras que 10 ml de clara de huevo en una reacción de 200 ml daba como resultado sólo una inhibición moderada. Además, la rotura espontánea del sustrato enzimático, PADAC, durante el curso del ensayo también contribuía al cálculo erróneamente bajo de la concentración de β -lactamasa.

65

ES 2 357 495 T3

Tabla 1. Expresión de β -lactamasa en huevos de gallinas tratadas con NLB-CMV-BL.

Gallina n°.	Promedio en mg de β -lactamasa por huevo	N°. de huevos de ensayo
1 Control	0,1 \pm 0,07	29
2 1522	0,31 \pm 0,07	20
3 1549	0,96 \pm 0,15	22
4 1581	1,26 \pm 0,19	12
5 1587	1,13 \pm 0,13	15
6 1790	0,68 \pm 0,15	13
7 1793	1,26 \pm 0,18	12

Control son los huevos de gallinas no tratadas. El nivel bajo de BL en estos huevos es debido a la rotura espontánea de PADAC durante el curso del ensayo cinético. Se transdujeron las otras gallinas con NLB-CMV-BL tal como se describe en el ejemplo 3. Se sometió a ensayo la clara de huevo de cada huevo por triplicado.

Ejemplo 5

Transferencia de tipo Western de β -lactamasa en clara de huevo

El análisis de transferencia de tipo Western de la misma clara de huevo del ejemplo 4 confirmó la presencia de β -lactamasa y proporcionó una medida más precisa de la cantidad de β -lactamasa presente en el huevo que el ensayo cinético del ejemplo 4, anterior.

Para realizar el análisis, se añadieron 10 μ l de clara de huevo a 30 μ l de Tris-Cl 0,5 M, pH 6,8, dodecilsulfato de sodio 10%(SDS), glicerol al 10%, 2-mercaptoetanol 1,43 M, azul de bromofenol al 0,001%. Se calentaron las muestras hasta 95°C durante 5 min., se separaron sobre SDS-PAGE al 12% y se transfirieron a membranas Immobilon P (Millipore). Se detectó β -lactamasa con dilución 1:500 de anti- β -lactamasa de conejo (5 prima-3 prima) y dilución 1:5000 de conjugado de HRP con IgG anti-conejo de cabra (Promega). Se visualizaron inmunotransferencias con el sistema de transferencia de tipo Western de quimioluminiscencia potenciada (ECL) (Amersham).

Se analizaron varias muestras de β -lactamas mediante transferencia de tipo Western y anticuerpo anti- β -lactamasa. Se muestran los resultados en la figura 5. Los carriles 1-4 de la banda contienen 5,2, 1,3, 0,325 y 0,08 μ g, respectivamente, de β -lactamasa purificada, expresada bacteriamente, añadida a la clara de huevo de control, formando una curva estándar. El carril 5 contiene clara de huevo de control de una gallina no tratada. En el carril 6 están 2 μ l de clara de huevo de la gallina 1522 (Betty Lu). Los carriles 7-8 contienen 1 y 2 μ l, respectivamente, de clara de huevo de la gallina 1790. Los carriles 9-10 contienen 1 y 2 μ l, respectivamente, de clara de huevo de la gallina 1793. Se pusieron alícuotas de 1 y 2 μ l de clara de huevo de la gallina 1549 en los carriles 11-12. Los carriles 13-14 mostraron 1 y 2 μ l, respectivamente, de clara de huevo de la gallina 1581. En el carril 15 se muestran 2 μ l de clara de huevo de la gallina 1587.

Se señala la posición de los estándares de pesos moleculares en la figura 5 a la izquierda de la banda en kilodaltons (kDa). La banda a 31 kDa es β -lactamasa. El peso molecular de la β -lactamasa en la clara de huevo es similar al de la β -lactamasa purificada. La β -lactamasa de clara de huevo también es una sola especie molecular, lo que indica que la síntesis era fiel a la secuencia de codificación de la β -lactamasa y que la β -lactamasa es muy estable en las células de magno así como en la clara de huevo. La banda a 13 kDa es una proteína de clara de huevo que reacciona de forma cruzada con el anticuerpo de anti- β -lactamasa.

ES 2 357 495 T3

Basándose en los resultados de la transferencia de tipo Western, la β -lactamasa en el carril 6 (de la gallina 1522, Betty Lu) se estima a 120 ng, o 2,4 mg por huevo, asumiendo 40 ml de clara de huevo por gallina. La β -lactamasa en el carril 9 (de la gallina 1793) se estima a 325 ng lo que corresponde a 13 mg por huevo. Los niveles de β -lactamasa por huevo tal como se estiman mediante el análisis de transferencia de tipo Western eran considerablemente más altos (hasta 10 veces más altos) que los niveles estimados mediante el ensayo de enzima de β -lactamasa del ejemplo 4. Tal como se explica anteriormente, se cree que la discrepancia en las estimaciones de proteína está provocada por la inhibición de la actividad de la enzima por la clara de huevo y la rotura del sustrato.

Debe anotarse que los hasta 13 mg de β -lactamasa por huevo indicados en el presente documento se produjeron mediante fundadores quiméricos, aves no completamente transgénicas. Tal como se indicó anteriormente, sólo el 2-15% de las células en cualquier tejido dado de fundadores quiméricos eran realmente transgénicas. Asumiendo que esta extensión de mosaicismo también se aplica al tejido de magno, entonces los magnos de las seis gallinas positivas en β -lactamasa de huevo sólo eran parcialmente transgénicas. Por lo tanto, se esperaría que las aves completamente transgénicas (crías G₁) expresen niveles mucho más altos, posiblemente, tan altos como 200 mg/huevo. Esta estimación es significativa ya que indica que los promotores no específicos de magno tales como el CMV pueden competir eficazmente con genes específicos de magno tales como *ovoalbúmina* y *lisozima* para la maquinaria de síntesis de proteína de clara de huevo.

Ejemplo 6

Aislamiento y transfección ex vivo de células blastodérmicas

En una realización alternativa de la invención, se transfectan las células blastodérmicas *ex vivo* con un vector de expresión.

En este procedimiento, se aíslan las células blastodérmicas dadoras a partir de huevos fertilizados de gallinas Barred Plymouth Rock usando un anillo anular estéril de papel de filtro Whatman que se coloca sobre un blastodermo y se levanta después de cortar a través de la membrana de la yema del anillo. Se transfiere el anillo que lleva el blastodermo unido a solución salina tamponada con fosfato (PBS) en una placa de petri ventral hacia arriba y la yema adherida se retira mediante pipeteo suave. The área opaca se disecciona aparte con una formación de bucle y se transfiere el blastodermo en estadio X translúcido por medio de una punta de pipeta de diámetro grande a un tubo para microcentrifugadora. Se aíslan aproximadamente 30,000-40,000 células por blastodermo y se recogen 10 blastodermos para un experimento típico.

Se dispersan las células mediante digestión con tripsina (0,2%) breve, se lava una vez mediante centrifugación a baja velocidad en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y entonces se transfectan con plásmidos linealizados por medio de lipofectina (16 mg/200 ml, BRL) durante 3 horas a temperatura ambiente. Los vectores mostrados en las figuras 2, 3 servirían como constructos de expresión adecuados en el presente documento. Se lavan las células libres de lipofectina con medio y entonces se inyectan 400-600 células en embriones en estadio X receptores G-irradiados (650 rad) de la línea criada al azar Athens-Canadian (línea AC). La inyección es a través de una pequeña ventana (~0,5 cm) dentro de la cavidad subgerminal bajo los blastodermos receptores. Se sellan las ventanas con membrana de cáscara de huevo fresca y cemento plástico de Duco. Entonces se incuban los huevos a 39,1°C en un incubador humidificado en una rotación de 90° cada 2 h.

Ejemplo 7

Identificación de mosaicos transgénicos mediante ensayo de PCR

De entre los polluelos que eclosionan a partir de embriones que contienen células blastodérmicas transfectadas o transducidas, sólo se conservan los que exhiben mosaicismo de pluma de Barred Plymouth Rock. Incluso si no está presente el gen indicador en el transgén, se puede identificar los mosaicos transgénicos mediante ensayo por PCR.

Para identificar los mosaicos transgénicos, se somete a ensayo el ADN de la sangre y de la pulpa de pluma negra de polluelos individuales mediante PCR para determinar la presencia del transgén usando un par de cebadores específicos para el transgén tal como se describe por Love *et al.*, Bio/Technology 12:60-63 (1994). Se inducen las quimeras de transgén, se extraen y se vuelven a inducir con gránulos de dietilestilbestrol (DES) y se analizan magnos escindidos para determinar la expresión de actividad indicadora. Se someten a ensayo la sangre y el hígado para monitorizar la especificidad de tejido.

Se recoge el ADN de sangre de macho y de hembra de 10 a 20 días después de la eclosión. Se extrae el ADN de la sangre usando un procedimiento de alto rendimiento novedoso de extracción de ADN desarrollado en nuestro laboratorio. En este procedimiento, se retira la sangre de una vena del ala a una jeringuilla esterilizada y se dispensa inmediatamente un gota en un pocillo de un plato de 96 pocillos de fondo plano que contiene un tampón que lisa exclusivamente membranas citoplasmáticas. Entonces, se centrifuga la placa brevemente, lo que sedimenta el núcleo. Se retira el sobrenadante y se añade un segundo tampón de lisis que libera el ADN genómico del núcleo y degrada las nucleasas. Se precipita con etanol el ADN en la placa, se lava con etanol al 70%, se seca y se resuspende en 100 μ l de agua por pocillo. Se pueden obtener hasta 80 μ g de ADN a partir de una gota (8 μ l) de sangre de polluelo. Se pueden

ES 2 357 495 T3

procesar al menos 768 muestras por una persona en un día y el ADN es adecuado para análisis por PCR y Taqman™ (Perkin Elmer/Applied Biosystems).

Entonces, se somete a prueba el ADN aislado para determinar la presencia de los transgenes usando el ensayo de detección de secuencias de Taqman para evaluar la eficacia del procedimiento de transducción del embrión. El sistema de detección de secuencias de Taqman permite la detección directa de una secuencia específica. Una sonda de oligonucleótidos marcados de manera fluorescente complementaria a una región interna de un producto de PCR deseado sólo es fluorescente si se fusiona con el producto de PCR deseado, que en este caso es complementario al transgén. Debido a que toda la detección se produce en el tubo de PCR durante el procedimiento de ciclación, el sistema de Taqman permite un PCR de alto rendimiento (no se necesita electroforesis en gel) así como la detección de secuencia análoga al y tan sensible como el análisis Southern. Se usa 1 µl del ADN aislado, que contiene 600-800 ng de ADN, para la reacción de Taqman. Cada reacción contiene dos grupos de pares de cebadores y de sondas de Taqman. El primer grupo detecta el gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) de pollo y se usa como control interno para la calidad del ADN genómico y también sirve como un estándar para la cuantificación de la dosis de transgén. El segundo grupo es específico para el transgén deseado. Se detecta la fluorescencia en un estereomicroscopio de disección equipado con detección de epifluorescencia. Las dos sondas de Taqman están unidas a diferentes pigmentos que presentan fluorescencia a longitudes de onda únicas: por tanto, ambos productos de PCR se detectan simultáneamente en un detector de secuencias ABI/PE 7700. Se estima que eclosionarán hasta 180 aves y que el 20% (36 aves) contendrán el transgén en su sangre.

Ejemplo de referencia 8

Identificación de células blastodérmicas con un minigen sin promotor correctamente integrado (PMG)

Tras la transfección con un vector dirigido de PMGI tal como los mostrados en la figura 8, se hacen crecer las células en una línea de alimentación en medio condicionado para producir colonias en las que todas o cerca de la mitad de las células son uniformemente verdes en fluorescencia. Se detecta la fluorescencia en un estereomicroscopio de disección equipado con detección de epifluorescencia. Una fluorescencia uniforme indica que el vector se ha integrado de manera estable en el genoma. De estos clones celulares, sólo un subgrupo pequeño tiene realmente el PMG insertado correctamente en el gen diana. La mayoría de los clones tienen el PMG integrado aleatoriamente en el genoma. Para identificar los clones que contienen un PMG correctamente integrado, se seleccionan usando un ensayo de PCR de TaqMan PCR, tal como se describe anteriormente. Se usan dos cebadores para amplificar un segmento del transgén en su sitio de integración. Un cebador está en el gen X, el gen exógeno que se expresa en el oviducto, y el otro justo fuera de la secuencia dirigida 5', de modo que el fragmento sólo se puede amplificar mediante la correcta inserción en el gen diana. Las colonias que contienen un transgén correctamente integrado se someten al paso limitado en cultivo sobre células de alimentación en presencia de una variedad de citoquinas que promueven su crecimiento en ausencia de diferenciación. Se inyectan las células en embriones receptores. Alternativamente, se almacenaron las colonias verdes y se inyectaron en los embriones receptores. Se seleccionan posteriormente polluelos eclosionados para determinar la presencia del transgén correctamente insertado.

Ejemplo de referencia 9

Detección azul/verde para la inserción de minigen sin promotor (PMGI)

Tras la transfección con un vector dirigido de PMGI como el de la figura 4, se hacen crecer las células durante un día en ausencia de una capa de alimentación y se separan las células verdes de las células azules/verdes usando un clasificador de células activadas por fluorescencia al día siguiente. Se hacen pasar rápidamente las células verdes sobre las células de alimentación antes de su inyección en los embriones receptores. También se seleccionan las células verdes tal como se hizo anteriormente para la correcta inserción.

Ejemplo 10

Producción de pollos G₁ completamente transgénicos

Se seleccionan machos para la cría debido a que un único macho puede dar lugar a de 20 a 30 crías G₁ por semana en contra de las 6 crías G₁ por hembra por semana, acelerando por tanto la expansión de G₁ transgénicos. Se complementa la alimentación de machos G₀ con sulfametazina, que acelera la maduración sexual de los machos de modo que puedan comenzar a producir esperma a las 10-12 semanas de edad en lugar de las 20-22 semanas sin influenciar su salud ni su fertilidad (Speksnijder e Ivarie, datos no publicados).

Se selecciona el ADN del esperma de todos los machos para determinar la presencia del transgén. Se recoge el esperma y se extrae el ADN usando Chelex-100. Rápidamente, se mezclan 3 µl de esperma y 200 µl de Chelex-100 al 5%, seguido de la adición de 2 µl de 10 mg/ml de proteinasa K y de 7 µl de DTT 2 M. Se incuban las muestras a 56°C durante 30-60 minutos. Se hierven las muestras durante 8 minutos y se agitaron en vórtex vigorosamente durante 10 segundos. Después de la centrifugación a de 10 a 15 kG durante 2-3 minutos, el sobrenadante está listo para el análisis de PCR o de Taqman. Se analizan los ADN mediante el ensayo de Taqman usando una sonda de Taqman y cebadores complementarios al transgén. De los 90 machos G₀, se estima que el 5%, o de 4 a 5, tendrán el transgén en el ADN de su esperma.

ES 2 357 495 T3

Tal como se anotó anteriormente en el ejemplo 4, la bandada transducida de NLB-CMV-BL incluía tres machos que tenían niveles significativos del transgén NLB-CMV-BL en su esperma tal como se determinó mediante el análisis por PCR (véase el ejemplo 10). Por tanto, se eligen estos machos para una cría adicional para obtener crías G_1 completamente transgénicas.

5

Mediante la cría de machos transgénicos de línea germinal con 90 hembras White Leghorn no transgénicas por semana, se estima que se obtendrán 16 crías G_1 por semana. Se sexan los polluelos eclosionados y se seleccionan para determinar la presencia del transgén en el ADN de su sangre mediante el ensayo de Taqman. Se obtendrán veinte machos y hembras G_1 transgénicas o 40 en total, lo que tardará hasta 3 semanas.

10

Se guardarán los machos para una cría adicional y se someten a prueba las hembras para la expresión de los transgenes en el huevo.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

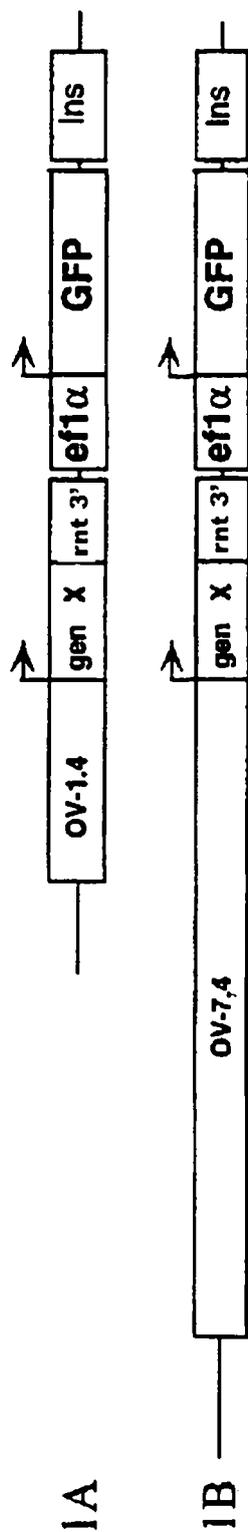
60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ave transgénica que porta un vector retroviral en el material genético de su tejido de línea germinar, en el que el vector comprende un gen exógeno y un promotor constitutivo, en relación operacional y posicional para expresar el gen exógeno, y el gen exógeno se expresa en el oviducto aviar del ave transgénica para producir una proteína exógena en la que la proteína exógena contiene una secuencia señal y se secreta en el lumen del oviducto de modo que la proteína se deposite en la clara de un huevo.
- 10 2. Un procedimiento para producir una proteína exógena en un oviducto aviar, que comprende:
- 15 proporcionar un vector retroviral que comprende una secuencia de codificación y un promotor constitutivo unido de manera operable a la secuencia de codificación, en el que el promotor puede efectuar la expresión de la secuencia de codificación en las células de glándulas tubulares de un oviducto aviar;
- 20 crear células transgénicas introduciendo el vector en células blastodérmicas embrionarias, en el que la secuencia del vector se inserta en el genoma aviar y en el que la introducción del vector en las células blastodérmicas embrionarias está mediada por retrovirus; y
- 25 derivar un ave transgénica madura a partir de células transgénicas, en el que las células de glándulas tubulares del ave transgénica expresan la proteína, y la proteína resultante se secreta en el lumen del oviducto, de modo que la proteína se deposita en la clara de huevo de un huevo.
3. Un procedimiento para producir un huevo aviar que contenga proteína exógena, que comprende:
- 30 proporcionar un vector retroviral que comprende una secuencia de codificación y un promotor constitutivo unido de manera operable a la secuencia de codificación, en el que el promotor puede efectuar la expresión de la secuencia de codificación en las células de glándulas tubulares de un oviducto aviar;
- 35 crear células transgénicas introduciendo el vector en células blastodérmicas embrionarias, en el que la secuencia del vector se inserta en el ave y en el que la introducción del vector en las células blastodérmicas embrionarias está mediada por retrovirus; y
- 40 derivar un ave transgénica madura a partir de células transgénicas, en el que las células de glándulas tubulares del ave transgénica expresan la secuencia de codificación, y la proteína resultante se secreta en el lumen del oviducto, de modo que la proteína se deposita en la clara de huevo de un huevo.
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, que comprende además la cría a partir de esta ave transgénica madura para producir crías, en el que las células de glándulas tubulares del ave transgénica de cría expresan la secuencia de codificación, y la proteína resultante se secreta en el lumen del oviducto, de modo que la proteína se deposita en la clara de huevo de un huevo.
- 45 5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, que comprende además la etapa de aislar la proteína del huevo.
- 50 6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que la etapa de introducir el vector en las células blastodérmicas embrionarias incluye administrar células auxiliares a un blastodermo embrionario, en el que las células auxiliares producen el retrovirus.
- 55 7. El ave transgénica de la reivindicación 1 o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que el promotor se selecciona del grupo que consta del promotor del CMV, el promotor del SV40 y el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV).
- 60 8. El ave transgénica de la reivindicación 1 o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que la proteína exógena es una proteína farmacéutica.
- 65 9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que el procedimiento comprende además formular la proteína como un medicamento.
10. El ave transgénica de la reivindicación 1 o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el que la proteína exógena se selecciona del grupo que consta de interferón, α -1 antitripsina, antitrombina III, colágeno, factores VIII, IX, X, fibrinógeno, insulina, lactoferrina, proteína C, activador de plasminógeno de tipo de tejido, somatotropina, anticuerpo, hormona de crecimiento humano, inmunotoxina, quimotripsina, factor de estimulación de colonias de granulocitos macrófagos, factor de estimulación de colonias de granulocitos y eritropoyetina.
11. El ave transgénica de la reivindicación 1 o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que el ave transgénica se selecciona del grupo que consta de un pollo o un pavo.

Figura 1



OV-1,4 & -7,4: promotores de ovoalbúmina de -1,4 y -7,4 kb

gen X: un gen o ADNc que codifica una proteína exógena

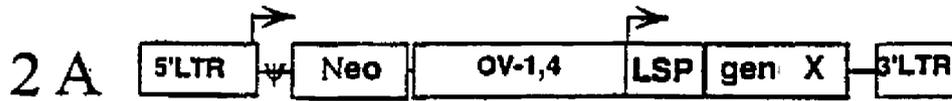
rnt 3': región no traducida 3' que contiene un sitio de poliadenilación

ef1α: promotor del factor de elongación 1α de traducción

GFP: gen de proteína fluorescente verde humanizada

Ins: elemento aislante de 1,2 kb

Figura 2.



➤ sitio de inicio de transcripción

5' & 3' LTR: repeticiones terminales largas de ALV

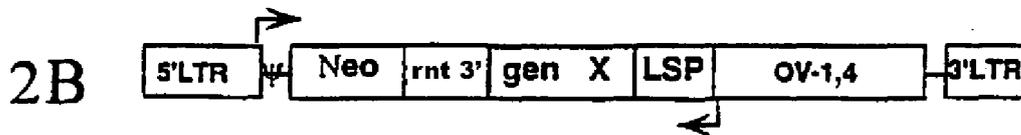
Ψ señal de empaquetamiento de virus

Neo: gen de resistencia a neomicina

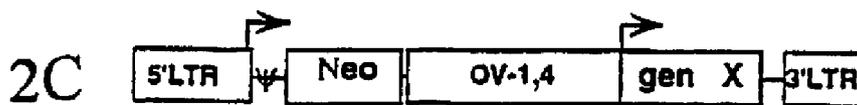
OV-1,4: promotor de ovoalbúmina de -1,4 kb

LSP: péptido señal de lisozima

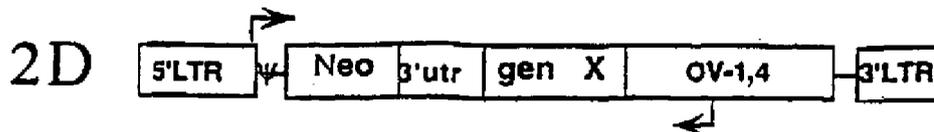
gen X: gen o ADNc que codifica una proteína exógena



rnt 3': región no traducida 3' que contiene un sitio de poliadenilación

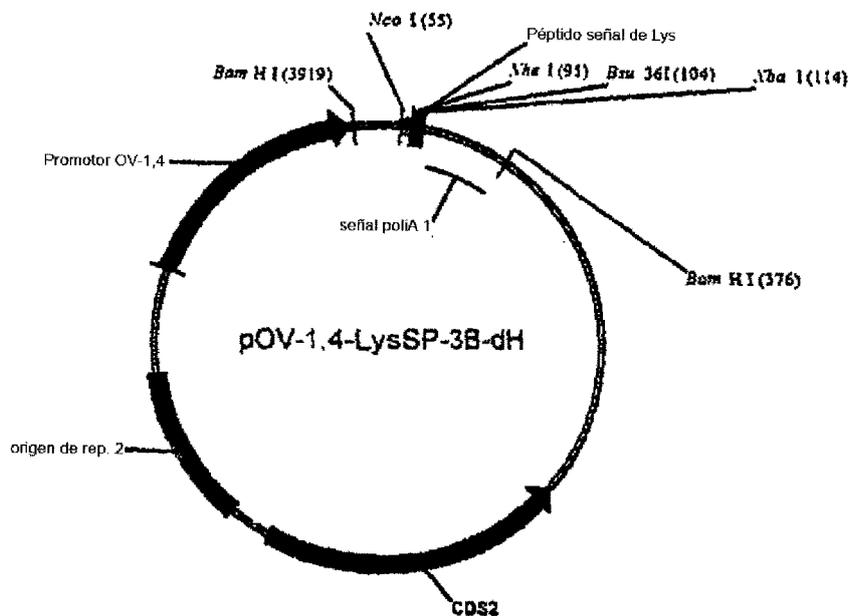


El mismo vector de A que carece del elemento LSP



El mismo vector de B que carece del elemento LSP

Figura 2E.



Péptido señal de lisozima

	M	G	S	L	L	I	L	V	L	C	F	L	P	L	A
	NcoI										NheI				
51	CCACCATGGG	GTCTTTGCTA	ATCTTGGTGC	TTGCTTCCT	GCCGCTAGCT										
	GGTGGTACCC	CAGAAACGAT	TAGAACCACG	AAACGAAGGA	CGGCGATCGA										
	A	L	G	▼											
	Bsu36I			XbaI									▼ : Sitio de escisión del péptido señal		
101	GCCTTAGGGC	CCTCTAGAG													
	CGGAATCCCG	GGAGATCTC													

Clonación PCR de ADNc

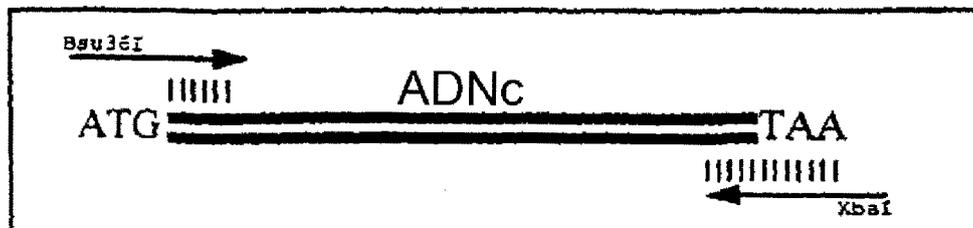


Figura 2F.



➤ sitio de inicio de transcripción

5' & 3' LTR: repeticiones terminales largas de ALV

Ψ señal de empaquetamiento de virus

Neo: gen de resistencia a neomicina

OV-1,4: promotor de ovoalbúmina de -1,4 kb

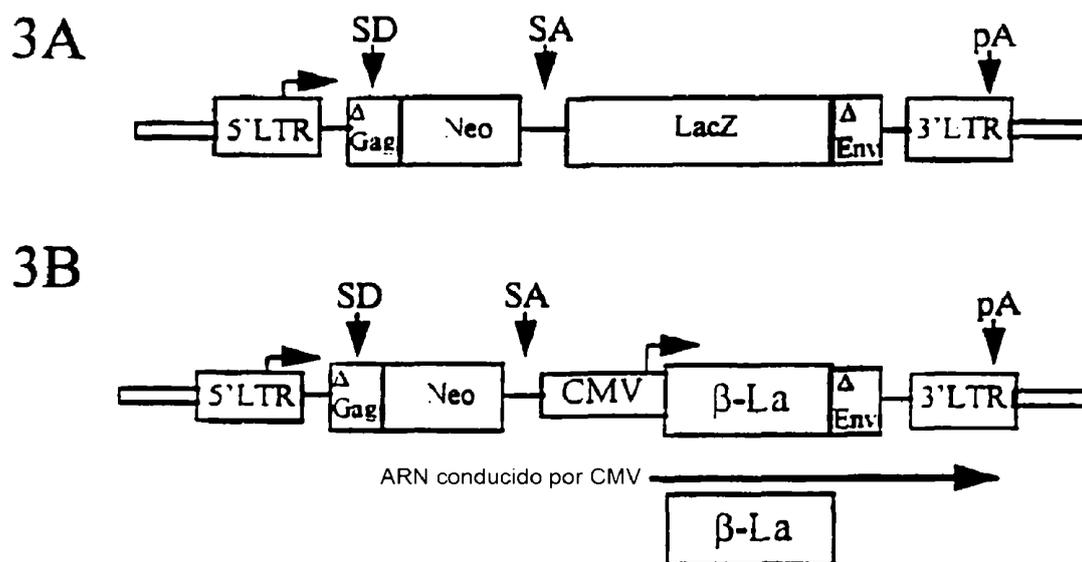
LSP: péptido señal de lisozima

gene X: gen o ADNc que codifica una proteína exógena

gene Y: gen o ADNc que codifica una proteína exógena

IRES: sitio interno de entrada al ribosoma

Figura 3.



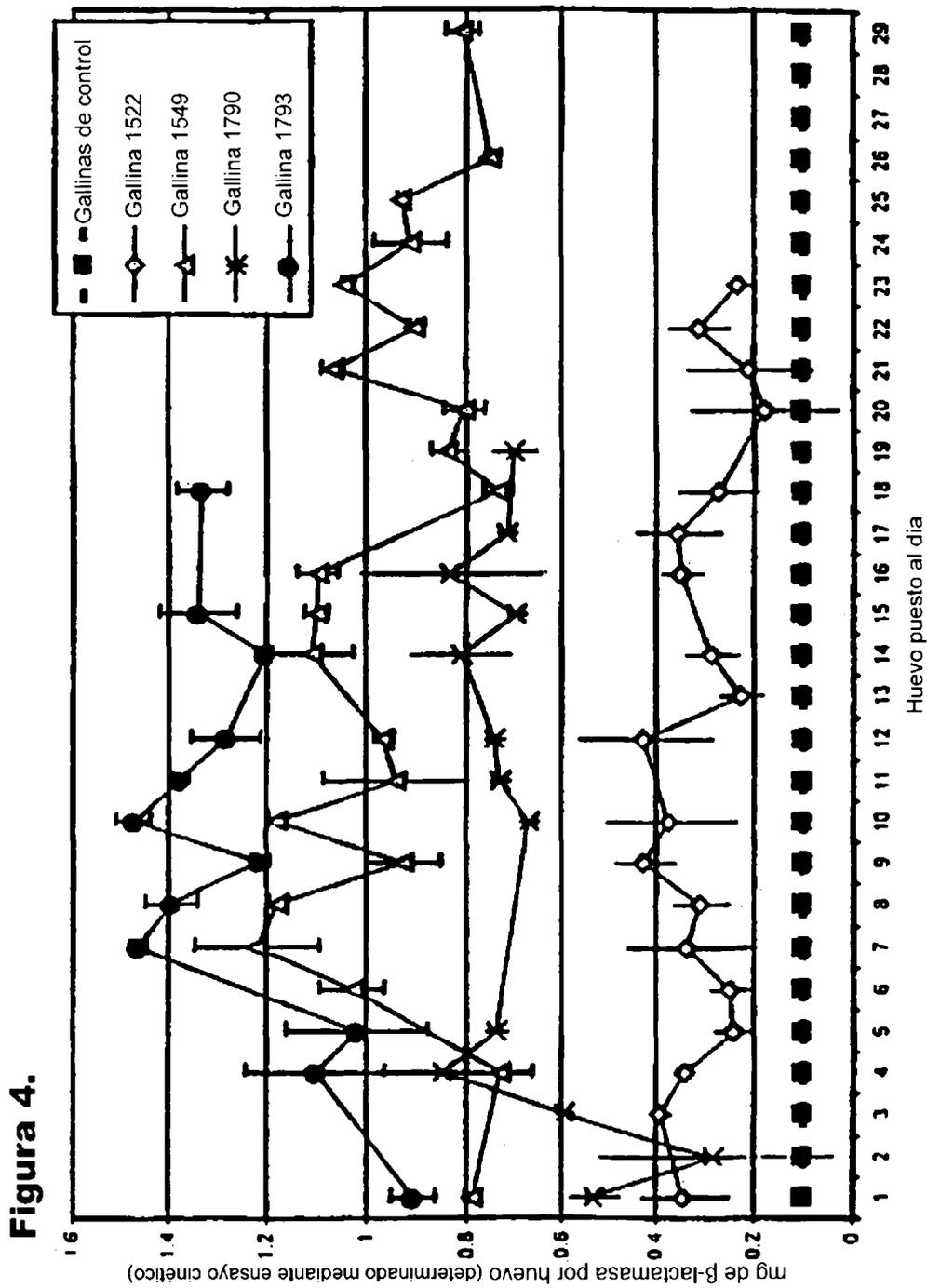


Figura 5

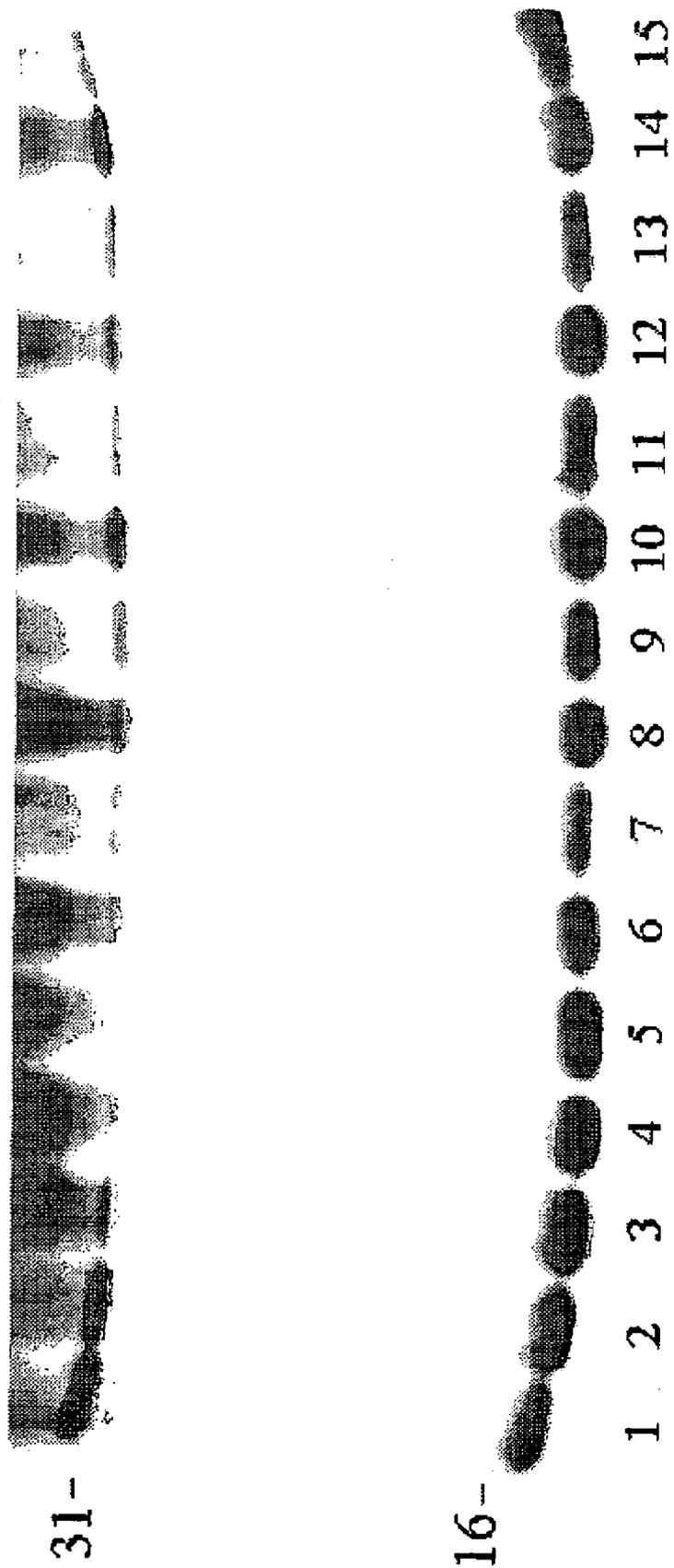
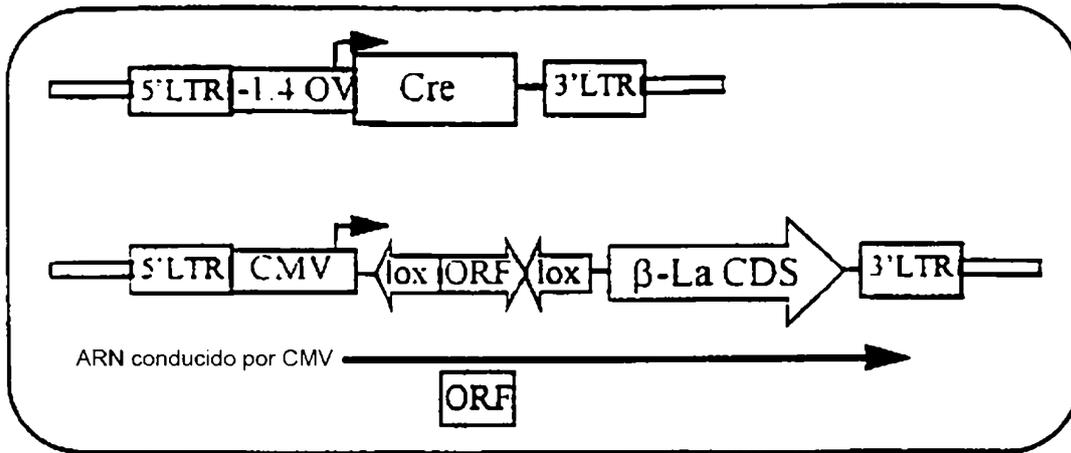


Figura 6.

6A

Célula no de magno.



6B

Célula de magno.

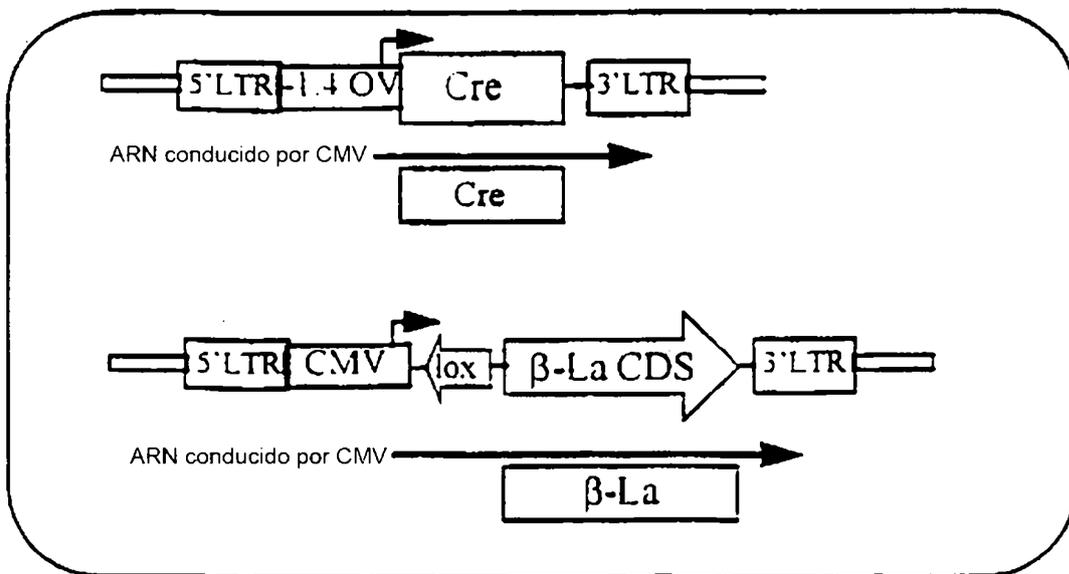


Figura 7.

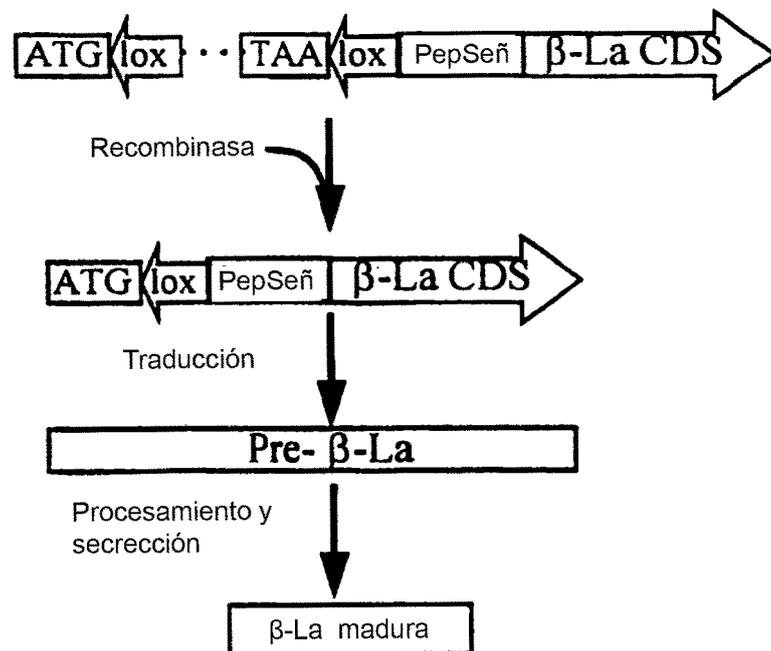
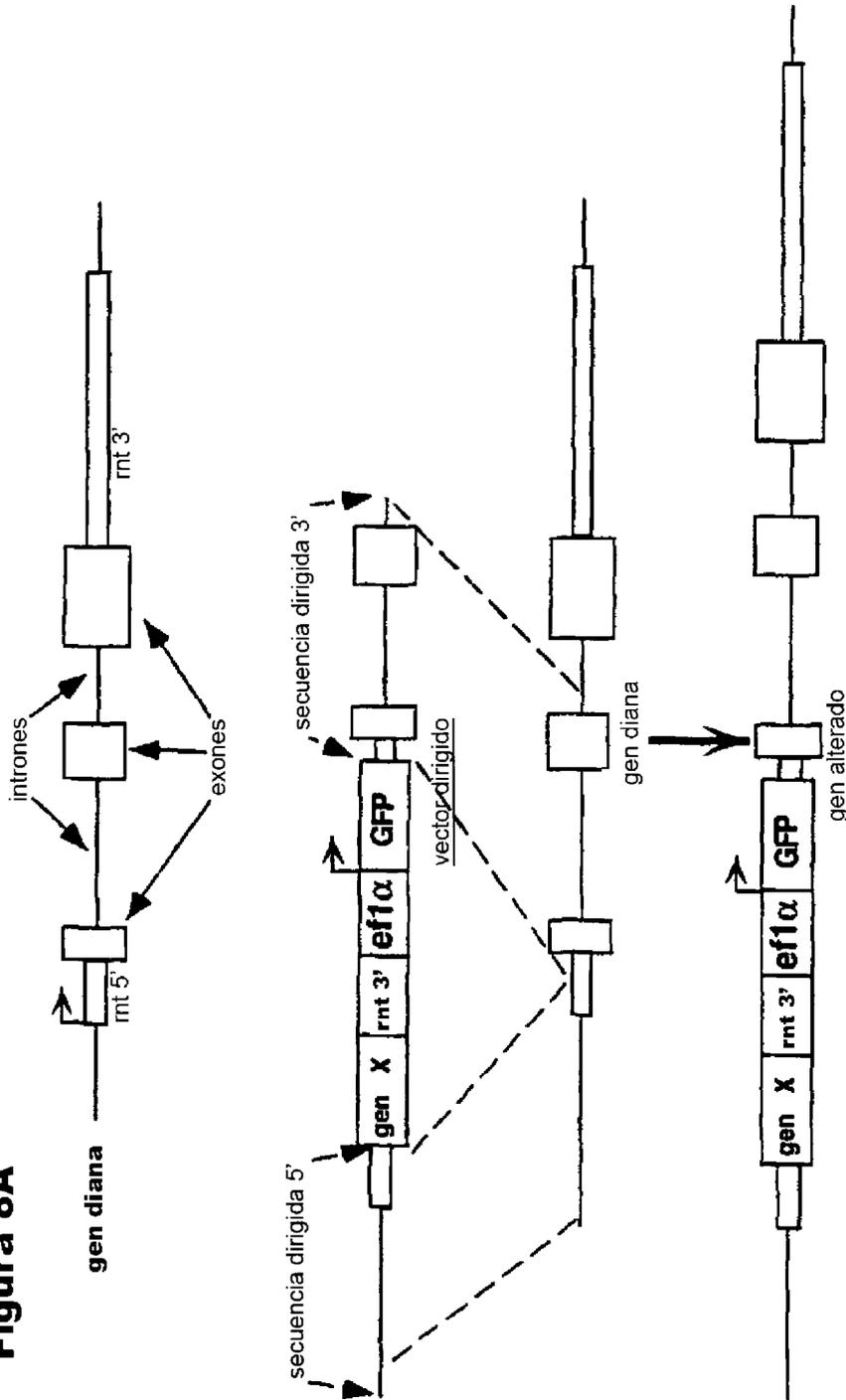
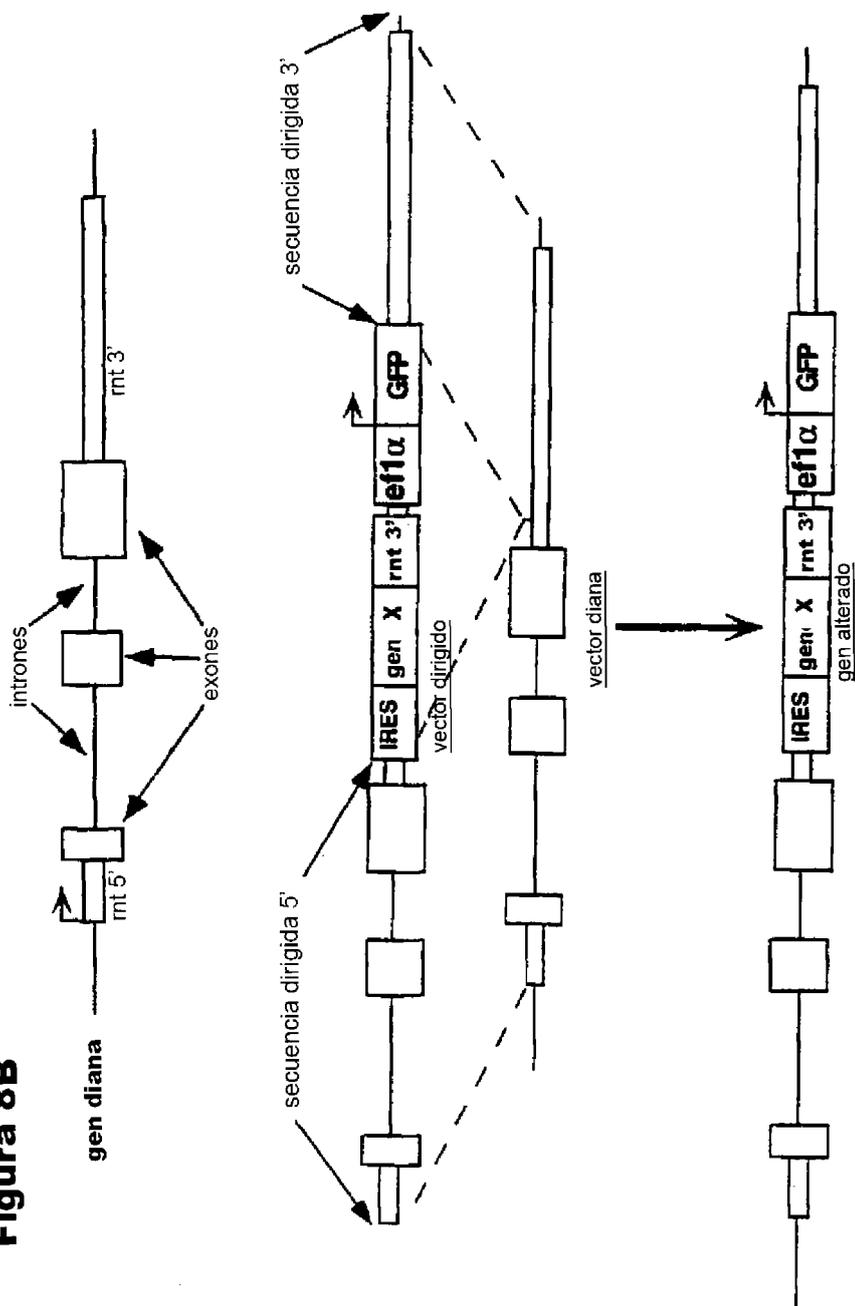


Figura 8A



gen X: gen oADNc que codifica una proteína exógena
rnt 5': región no traducida 5' que precede al codón de inicio
rnt 3': región no traducida 3' que contiene un sitio de poliadenilación
ef1α: promotor del factor de elongación 1α
GFP: gen de proteína fluorescente verde humanizada

Figura 8B



- gen X:** gen oADNc que codifica una proteína exógena
- rnt 5':** región no traducida 5' que precede al codón de inicio
- rnt 3':** región no traducida 3' que contiene un sitio de poliadenilación
- efl1α:** promotor del factor de elongación 1α
- GFP:** gen de proteína fluorescente verde humanizada

Figura 9

