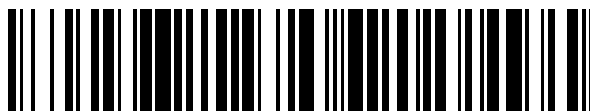


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 622**

51 Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07859364 .7**
96 Fecha de presentación: **23.11.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2097444**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.09.2009**

54 Título: **MÉTODO QUE UTILIZA UN ANIMAL TRANSGÉNICO CON RESPUESTA INMUNE POTENCIADA.**

30 Prioridad:
24.11.2006 HU 0600870
14.08.2007 HU 0700534

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.11.2011

73 Titular/es:
AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY CENTER
P.O.BOX 411 SZENTGYORYI A. U. 4.
2100 Gödöllő, HU y
Eötvös Lorand University

72 Inventor/es:
BÖSZE, Zsuzsanna; KACSKOVICS, Imre;
CERVENAK, Judit; HIRIPI, László y
BENDER, Balázs

74 Agente: **Aznárez Urbieto, Pablo**

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).

ES 2 368 622 T3

DESCRIPCIÓN

Método que utiliza un animal transgénico con respuesta inmune potenciada

La presente invención se refiere al campo de la inmunología. De forma más específica, la invención se refiere a un animal transgénico no humano (Tg) capaz de desarrollar una respuesta inmune humoral potenciada contra un antígeno en comparación con un animal de control no transgénico de la misma especie, comprendiendo dicho animal transgénico no humano un constructo genético que provee una actividad potenciada del receptor Fc neonatal (FcRn) relacionado con un MHC de clase I.

La invención proporciona un método no terapéutico para desarrollar una respuesta inmune humoral potenciada, utilizando tal método el citado animal transgénico no humano y un antígeno de interés.

En respuesta al antígeno, las células plasmáticas se desarrollan a partir de los linfocitos B en una reacción inmune humoral específica que alcanza su máximo aproximadamente 1 a 2 semanas después del insulto antigénico. El encuentro secundario con el antígeno resulta en la secreción de anticuerpos con mayor afinidad por el antígeno, un máximo incrementado de titulación de anticuerpo en suero específico y niveles persistentes de anticuerpos en suero. El mantenimiento de niveles de anticuerpo en suero específicos requiere la secreción continua de Ig por las células plasmáticas y su protección contra una eliminación rápida. Mientras IgM, IgA, IgE se eliminan de forma relativamente rápida del cuerpo, la vida media de la IgG en suero se prolonga. En 1958, Brambell describió un sistema de receptores saturables que mediaba el transporte de la IgG materna (Brambell, 1958); después, dedujo la presencia de un receptor similar o idéntico que protegía la IgG frente al catabolismo, para convertirla en la superviviente más longeva de todas las proteínas plasmáticas (Brambell y col., 1964). Se demostró finalmente que el receptor de Brambell (FcRB) mediaba la transmisión de la IgG en el período antenatal y/o neonatal, en esta expresión llamada FcRn (receptor de Fc neonatal) como la protección de la IgG contra el catabolismo (Junghans, 1997).

El FcRn fue identificado en primer lugar en roedores como un receptor que transfería inmunoglobulinas maternas de la madre al recién nacido a través del intestino neonatal (Rodewald, 1976; Simister y Rees, 1985). Desde su descripción original en intestino neonatal de rata por Simister y Mostov (Simister and Mostov, 1989), varios estudios han demostrado que el FcRn desempeña un papel fundamental en la regulación del transporte de la IgG dentro y a través de células de diferente origen (Antohe y col., 2001; Claypool y col., 2004; Dickinson y col., 1999; Kobayashi y col., 2002; McCarthy y col., 2000; Ober y col., 2004; Spiekermann y col., 2002). También sirve para rescatar la IgG y la albúmina, las dos proteínas solubles más abundantes en el suero, de la degradación, prolongando así sus vidas medias (Ghetic y col., 1996; Israel y col., 1996; Junghans y Anderson, 1996). En un principio se pensó que el mecanismo estaba mediado por las células endoteliales que forran los vasos sanguíneos (Borvak y col., 1998); sin embargo, descubrimientos recientes sugieren que este proceso también tiene lugar en otras células (Akilesh y col., 2007; Lu y col., 2007). Dentro de estas células, el FcRn reside predominantemente en los endosomas tempranos/de reciclaje, donde encuentra la IgG y la albúmina internalizada mediante endocitosis en fase fluida. El ambiente ácido de los endosomas facilita la interacción. La IgM y la albúmina unidas se vuelven a reciclar en la superficie y se liberan de la célula, mientras que los ligandos no unidos son transportados aguas abajo hacia la degradación lisosomal (Anderson y col., 2006; Roopenian y Akilesh, 2007). Datos más recientes apoyan un nuevo concepto en el que el FcRn desempeña un papel importante en la fagocitosis mediada por IgG (Vidarsson y col., 2006).

La molécula funcional de FcRn es un heterodímero compuesto por una cadena- α (o cadena pesada) similar al MHC de clase I y la microglobulina beta 2 ($\beta 2m$; nombre alternativo: cadena ligera) (Simister y Mostov, 1989) que se une a la IgG y a la albúmina de forma dependiente del pH (Chaudhury y col., 2003; Simister y Mostov, 1989) aunque en distintos sitios de unión (Andersen y col., 2006; Chaudhury y col., 2006).

Se ha clonado el FcRn a partir de una gran variedad de especies de mamíferos, entre ellas rata (Simister y Mostov, 1989), ratón (Ahouse y col., 1993), humano (Story y co., 1994), bovino (Kacskovics y col., 2000), zarigüeya (Adamski y col., 2000), oveja (Mayer y col., 2002), cerdo (Schnulle y Hurley, 2003; Zhao y col., 2003), camello y perro (Kacskovics y col., 2006b). Más recientemente, los presentes inventores clonaron y caracterizaron la cadena alfa del FcRn de conejo. Aunque la mayor parte de las funciones que cumple el FcRn se han descrito en ratones, estudios en otros mamíferos sugieren que el papel del FcRn en el catabolismo de la IgG es similarmente crucial en todos los mamíferos investigados, como roedores, humanos y primates (Ghetie y Ward, 2002), cerdo (Harmsen y col., 2005) y bovino (Kacskovics y col., 2006a).

Se ha demostrado recientemente en dos modelos de ratón diferentes que la sobreexpresión de la cadena alfa del FcRn bovino (bFcRn) alargaba significativamente la vida media de la IgG de ratón en estos animales (Bender y col., 2007; Lu y col., 2007), indicando que el bFcRn forma un complejo funcional con la $\beta 2m$ ($m\beta 2m$) de ratón y que se une a la IgG de ratón y humanas. Los presentes inventores descubrieron también que la sobreexpresión del bFcRn en ratones transgénicos (Tg) (ratones empleados como los que utilizaron Bender y col., 2007) permitía que estos animales produjeran un nivel significativamente elevado de IgG e IgM específicas del antígeno a su inmunización.

La WO 2007061292 describe la preparación de anticuerpos monoclonales donde células productoras de anticuerpos son transfectadas con un ácido nucleico que codifica el gen para FcRn. Las células modificadas expresan FcRn y la producción de anticuerpos es elevada. Los autores no proporcionan la divulgación adecuada sobre la

5 preparación de animales transgénicos ni sobre los animales mismos, no obstante mencionan las ventajas de animales no humanos con al menos una copia (adicional) de ácido nucleico que codifica FcRn para sobreregular los niveles de anticuerpos en sangre. Sin embargo, la enseñanza es claramente teórica y se basa en su descripción, que enfoca la producción de anticuerpos monoclonales *in vivo*, por ejemplo en el líquido ascítico de la rata. No indican tampoco la

Queda claro que sigue existiendo la necesidad en la técnica de una provisión mejorada de inmunoglobulina terapéutica, de investigación y de diagnóstico de alta calidad y cantidad. Para cumplir con esta necesidad, la presente invención proporciona animales transgénicos que responden a retos antigénicos con un nivel sorprendentemente elevado de reacción inmune humoral específica.

10 Se descubrió sorprendentemente que con ratones BAC Tg con una sobreexpresión dependiente del número de copias de la cadena- α de FcRn bovino (codificado por el gen FCGRT bovino) ~~no~~ resultó en que la cadena- α de FcRn bovino formaba un complejo funcional con $\beta 2m$ de ~~ratón~~ y aumentaba significativamente la vida media de la IgG humana y de ratón administrada exógenamente, sino que estos animales transgénicos mostraban también una
15 respuesta inmune humoral sorprendentemente incrementada a su inmunización en comparación con sus controles de tipo salvaje. La mayoría de los anticuerpos específicos para el antígeno fueron IgG, sin embargo el título de IgM aumentó también durante la respuesta inmune secundaria. A la hora de analizar las posibles razones, los presentes inventores detectaron un número significativamente mayor de células-B específicas del antígeno, células dendríticas y un influjo masivo de neutrófilos en los órganos linfoides secundarios a la inmunización en el ratón transgénico con BFcRn en comparación con sus controles de tipo salvaje. Se debe mencionar que se observaron cambios similares,
20 aunque menos sorprendentes, en los controles de tipo salvaje. Como consecuencia, se podría demostrar que los niveles en aumento de IgG e IgM específicas para el antígeno en los animales Tg bFcRn resultaban no sólo de la protección incrementada de la IgG sino también de la mayor expansión clonal de células-B específicas del antígeno y, por consiguiente, de una síntesis más resistente de la inmunoglobulina en comparación con sus controles de tipo salvaje. Estos resultados señalan un nuevo papel para el FcRn en la respuesta inmune. La presente invención es la primera en
25 revelar que, debido al notable estado del FcRn sobreexpresado que no tiene lugar en animales normales, se produce un gran efecto en la respuesta inmune con la inmunización, lo que hace que el sistema sea especialmente útil para la producción de distintos tipos de anticuerpos frente a una amplia gama de antígenos.

Sumario de la Invención

En su sentido más amplio, la invención es tal como se detalla en la reivindicación independiente.

30 En una realización preferente, la presente invención proporciona un método donde dicha potenciación de la respuesta inmune humoral comprende la producción de altos niveles de inmunoglobulinas con la inmunización con un antígeno, teniendo dicho FcRn una afinidad específica por las inmunoglobulinas producidas por el mencionado animal a dicha inmunización.

35 En una realización preferente, la presente invención proporciona un método donde dicha potenciación de la respuesta inmune humoral comprende la potenciación de la expansión clonal de células B específicas del antígeno.

En una realización preferente, la presente invención proporciona un método donde dicha potenciación de la respuesta inmune humoral comprende estimular el flujo de neutrófilos en los órganos linfoides secundarios.

40 En una realización preferente, la presente invención proporciona un método donde dicha potenciación de la respuesta inmune humoral comprende estimular el flujo de células dendríticas y/o macrófagos en los órganos linfoides secundarios.

En una realización preferente, la presente invención proporciona un método donde dichos órganos linfoides secundarios comprenden el bazo.

En una realización preferente, la presente invención proporciona un método donde dicho antígeno es un inmunógeno débil.

45 En una realización, la presente invención proporciona un método para producir inmunoglobulinas, comprendiendo dicho método al menos una etapa donde el protocolo aplicado se ajusta al hecho de que el citado animal Tg desarrolla el mismo nivel de respuesta inmune humoral con un número inferior de retos antigénicos en comparación con un animal de control no transgénico de la misma especie.

50 En todavía otra realización, la presente invención proporciona un método para producir inmunoglobulinas, comprendiendo dicho método al menos una etapa donde el protocolo aplicado se ajusta al hecho de que el citado animal Tg desarrolla más rápidamente el mismo nivel de respuesta inmune humoral en comparación con un animal de control no transgénico de la misma especie.

En una realización preferente, la presente invención proporciona un método donde dicho animal es un mamífero no humano.

En una realización preferente, la presente invención proporciona un método donde dicho mamífero es un roedor.

En una realización preferente, la presente invención proporciona un método donde tal roedor es un ratón.

5 En una realización preferente, la presente invención proporciona un método donde dicho mamífero es un conejo.

En una realización preferente, la presente invención proporciona un método donde dicho mamífero se selecciona del grupo consistente en bovinos, cerdos, camellos, cabras, ovejas, perros, burros y caballos.

10 En una realización preferente, la presente invención proporciona un método donde dicho mamífero transgénico se obtiene de una cepa útil para la producción de anticuerpos monoclonales o que se modifica genéticamente para ser más adecuada para la producción de anticuerpos monoclonales.

En una realización preferente, la presente invención proporciona un método donde dicho animal transgénico se obtiene de una cepa útil para la producción de anticuerpos policlonales o que se modifica genéticamente para ser más adecuada para la producción de anticuerpos policlonales.

15 En una realización preferente, la presente invención proporciona un método donde la citada inmunoglobulina es IgG.

En una realización preferente, la presente invención proporciona un método donde dicha inmunoglobulina es IgM.

En una realización preferente, la presente invención proporciona un método donde dicho animal es transgénico para producir inmunoglobulinas humanas o humanizadas.

20 En una realización preferente, la presente invención proporciona un método donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena- α de la proteína FcRn se ha mutado y donde tal mutación convierte el sitio de unión de la albúmina de dicha proteína FcRn en no funcional.

En una realización preferente, la presente invención proporciona un método, utilización o animal, donde dicha secuencia de ácido nucleico codifica una proteína quimérica de FcRn.

25 En una realización preferente, la presente invención proporciona un método donde la citada actividad potenciada de FcRn se proporciona mediante la integración de más de una copia funcional de una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho FcRn en el genoma del citado animal.

En una realización preferente, la presente invención proporciona un método donde el citado constructo genético comprende la inserción del clon BAC de bovino #128E04 o la inserción del clon BAC de conejo #262E02.

30 Descripción Detallada

Se describe aquí un método para producir un animal Tg no humano capaz de desarrollar una respuesta inmune humoral potenciada frente a un antígeno en comparación con un animal de control no transgénico de la misma especie, método que comprende la introducción dentro de dicho animal no humano de un constructo genético que provee la actividad del receptor Fc neonatal (FcRn) relacionado con un MHC de clase I.

35 Bender y col. (Bender y col., 2004) describieron un animal Tg que se elaboró mediante la introducción del gen que codifica la cadena- α de la proteína FcRn bovina en un ratón FVB/N mediante el clon bovino BAC #128E04, con el fin de estudiar la regulación y la función transcripcional del FcRn bovino *in vivo*.

La US 2006/031954 y Petkova y col. (Petkova y col., 2006) describen ratones Tg noqueados que comprenden una disrupción homocigota de FcRn y un transgén humano de FcRn (hFcRn). Esta adición aumenta significativamente la vida media de la IgG humana administrada exógenamente; la expresión del hFcRn es similar a los niveles de expresión endógena. Mencionan asimismo, sin añadir detalles específicos, que la expresión del FcRn a niveles sustancialmente más altos que los endógenos puede resultar útil. Se especula que los niveles de expresión pueden aumentar 10 hasta 100 veces por encima del nivel de expresión endógena gracias a la utilización de vectores de expresión fuertes. Estas descripciones enseñan diversos constructos distintos para obtener los animales Tg. En un primer caso, se utilizó un clon de cósmido humano de 33 kb que incluye el gen hFcRn completo más las secuencias flanqueantes 5' de 10 kb y 3' de 10 kb. Los autores llamaron este animal Tg "línea transgénica 32 de hFcRn genómico". En un segundo caso, la "línea transgénica 276 de ADNc" contiene un constructo genético que comprende la cadena- α de hFcRn clonada en el vector E que lleva un potenciador del CMV y el promotor de la β -actina de pollo. En un tercer caso, sus animales transgénicos contienen un constructo genético que comprende un fragmento XhoI de 34 kb que contiene el gen hFcRn completo a partir de una librería de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) derivados de humano de Genome Systems, Inc. Los autores aparentemente crearon varias líneas de ratones Tg por manipulación genética directa (tal como con ratones C57BL/6J y BXSb/MpJ) o por cruzamiento convencional (por ejemplo, con cepas MRL/MpJ y NZM2410).

Lu y col. describieron ratones Tg que incluían bFcRn en sus glándulas mamarias mediante la utilización de un constructo con elementos reguladores específicos de las glándulas mamarias (Lu y col., 2006). Se establecieron varias líneas de ratón con distintos números de copias de bFcRn en el rango de 1 a 15, y con números de copias de b2m bovino en el rango de 1 a 10. Se examina la expresión y se documentan variaciones en el nivel de IgG en suero. Este sistema, sin embargo, sólo proporciona una expresión limitada de bFcRn con la lactancia en las células epiteliales mamarias de los acinos y se utilizó para estudiar el transporte de IgG en la glándula mamaria de lactancia. No se han utilizado estos animales para analizar la respuesta inmune. Los constructos empleados para generar estos ratones Tg fueron dos vectores de expresión en los que el promotor beta-caseína de cabra regula la transcripción de los genes interesados e insertados, uno que comprende las secuencias que codifican la cadena pesada (α) (pBC1-bFcRn) y el otro que codifica la cadena ligera (pBC1-b β 2m) del FcRn bovino. Los constructos genéticos que se insertan en los animales Tg son fragmentos generados por digestión con las enzimas NotI y Sall para producir una cadena pesada de 16,9 kilobases (kb) y una cadena ligera de 16,1 kb, que fueron microinyectadas en huevos de ratón Kunning White fertilizados a igual concentración.

Yoshida y col. (Yoshida y col., 2006) estudiaron el papel de FcRn de ratón (mFcRn) en el epitelio intestinal en la mediación de la inmunidad antimicrobiana. Establecieron líneas de ratón Tg FcRn en las que mFcRn β 2m fueron expresados específicamente por las células epiteliales intestinales mediante el promotor del gen para la proteína intestinal de unión a ácidos grasos específicos de los tejidos (IFABP), para crear ratones IFABP-mFcRnTg/m β 2mTg. Sobreexpresaron m β 2, también, para asegurar que no era limitador del sustrato en la expresión del transgén de FcRn. Aquí de nuevo, los animales Tg fueron retrocruzados entonces en ratones FcRn-/-, luego en BALB/c ó C57BL/6 (CD45.2+).

El documento WO 015708 describe la clonación y caracterización de ADNc de FcRn de rumiante y su uso potencial para generar animales transgénicos (opcionalmente en combinación con un transgén de beta-2-microglobulina).

El documento EP 1790716 describe un método para producir un anticuerpo, método que cuenta con la producción aumentada de anticuerpos observada con la transfección de una célula productora de anticuerpos (por ejemplo un hibridoma) con un vector de expresión de FcRn.

El documento WO 991309 describe un transgén que dirige la expresión de una molécula inmunoestimuladora (por ejemplo, IL-6) específicamente en la mucosa.

Tal como se utiliza aquí, el término “animal no humano” abarca los animales del orden de los Vertebrados, preferentemente un mamífero. Los animales no humanos para los cuales la presente invención es aplicable pueden seleccionarse en base a aquellos criterios funcionales capaces de producir inmunoglobulinas o equivalentes funcionales de las mismas. En realizaciones preferentes, los animales de la invención incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, otros roedores, conejos, cerdos, cameloides, ovejas, cabras, bovinos, burros y caballos. En una realización aún más preferente, el animal es un ratón, un conejo, un cerdo, una oveja, una cabra y un bovino. La utilización de cualquier animal no humano comúnmente empleado en la técnica para producir inmunoglobulinas, anticuerpos monoclonales o antiseros policlonales forma parte del alcance de la invención.

Tal como se utiliza aquí, la expresión “animal de control de la misma especie” o “animal de control no transgénico de la misma especie” describe un animal que no estaba sometido a los procedimientos implicados en la producción del animal Tg. Sin embargo, el animal de control de la misma especie es tratado y mantenido de forma similar al animal Tg durante los procedimientos necesarios para la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales, por ejemplo para la inmunización primaria, para la(s) inmunización(es) de refuerzo según se necesite y durante todo el proceso de producción de anticuerpos.

Tal como se utiliza aquí, el término “inmunoglobulinas” se refiere a glicoproteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas que funcionan como anticuerpos. Los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina” se utilizan aquí indistintamente. Los anticuerpos son proteínas huésped que comprenden uno de los principales efectores del sistema inmunitario adaptativo. Se ha aprovechado su utilidad ya que han sido utilizados y siguen utilizándose extensamente como reactivo diagnóstico y de investigación. Se están convirtiendo también en una herramienta terapéutica importante en el arsenal del médico para tratar enfermedades. Los anticuerpos se utilizan para el análisis, la purificación y el enriquecimiento, y para mediar o modular las respuestas fisiológicas. La capacidad de los anticuerpos para unirse a un antígeno con un alto grado de afinidad y especificidad ha conducido a su utilización omnipresente en múltiples disciplinas científicas y médicas. La interacción antígeno-anticuerpo es fundamental para la función biológica natural del anticuerpo, así como para su uso como reactivo terapéutico o de investigación.

En su estructura, los anticuerpos son globulinas (en la región- γ de la electroforesis proteica). En los mamíferos existen cinco tipos de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (Ig representa inmunoglobulina, que se utiliza también a lo largo de toda la presente descripción para los anticuerpos). Estos se clasifican de acuerdo con las diferencias en los dominios constantes de su cadena pesada. Cada clase de inmunoglobulinas difiere en sus propiedades biológicas y ha evolucionado para enfrentarse a distintos antígenos. Se puede encontrar IgA en zonas que contienen mucosidad (por ejemplo en el intestino, en el tracto respiratorio o en el tracto urogenital) e impide la colonización de las zonas mucosas por patógenos. La IgD funciona principalmente como receptor de antígenos en las células B. La IgE se une a alérgenos

y desencadena la liberación de histamina de los mastocitos (mecanismo subyacente de la alergia) y proporciona también protección contra los helmintos (gusanos). La IgM se expresa en la superficie de las células B y también en una forma secretada para eliminar patógenos en las etapas tempranas de la inmunidad mediada por las células B. La IgG proporciona la mayor parte de inmunidad basada en anticuerpos contra la invasión de patógenos.

5 En una realización preferente de la presente invención, la inmunoglobulina que se produce es IgG, aunque el alcance de la invención no se limita al isotipo (clase) IgG, o al hecho de que la IgG pueda comprender modificaciones, tal como se expone más abajo.

10 Las IgG pueden clasificarse en distintas formas o subclases, que resultan de la duplicación de los genes en varios mamíferos. Existen múltiples subclases de IgG en roedores, humanos, rumiantes domesticados, caballos, cerdos, camélidos y cobayas, poseyendo las distintas subclases diferentes características biológicas. Por ejemplo, las IgG1 e IgG3 humanas adornan las células fagocíticas debido a su alta afinidad por FcγR1. Por tanto, las IgG1 e IgG3 pueden ser especialmente importantes en: (a) la eliminación de complejos pequeños IgG-Ag y (b) estimular positiva o negativamente el desarrollo de células B y la producción de anticuerpos. La IgG3 es un activador potente para el complemento y la IgG1 es la mayor IgG en suero que es transportada preferentemente por toda la placenta (Janeway Jr. y col., 2001). Es bien sabido que la diversidad de subclases varía ampliamente entre los mamíferos. Los conejos sólo tienen un gen para IgM, mientras que los ratones y humanos expresan cuatro IgG y los caballos tienen siete. Los bovinos tienen tres IgG y existen cinco genes putativos de las subclases de IgG en los cerdos. Es probable que se encuentren diferencias similares en las funciones biológicas y expresión relativa entre las subclases de inmunoglobulina en mamíferos menos estudiados (Butler, 2006).

20 La presente invención se puede utilizar para potenciar la producción de uno o más de los subtipos de IgG sin limitaciones específicas. Sin embargo, es posible que un isotipo de la IgG producido por el animal receptor se una más estrechamente a la proteína FcRn que comprende una cadena-α exógena específica de FcRn más que la proteína FcRn que comprende otra cadena-α exógena de FcRn. Forma parte del alcance de la presente invención la utilización de un transgén para la cadena-α específica de FcRn con el fin de enriquecer la cantidad o la proporción de un subtipo específico de IgG en el antisuero producido mediante la selección del transgén de FcRn con capacidad de unión óptima y actividad hacia dicho subtipo de IgG.

En otra realización preferente de la presente invención, la inmunoglobulina producida es IgM. La IgM elabora aproximadamente un 10% del total de inmunoglobulinas plasmáticas y forma un componente principal de los anticuerpos producidos en la etapa temprana frente a los antígenos de la membrana celular, que son de antigenicidad compleja, microorganismos infecciosos y antígenos solubles. Con respecto a su estructura, la IgM tiene estructura de pentámero *in vivo*. Las cinco subunidades que constituyen la estructura pentámero de IgM se estructuran en cuatro cadenas similares a la IgG. Una de las mayores diferencias en comparación con la estructura de la IgG es que la IgM se caracteriza por tener una cadena pesada μ. Además, se diferencian en que la cadena μ tiene un dominio ~~as~~ en su región constante que la cadena γ y la IgM tiene una cadena polipeptídica llamada cadena J que no se encuentra en la IgG y que es tenida en cuenta para facilitar la polimerización de las cadenas μ antes de que la IgM sea secretada a partir de células productoras de anticuerpos. Se han hecho intentos en la técnica para producir, mediante metodologías recombinantes, una IgM funcionalmente equivalente al producto natural (véase por ejemplo US 2007154469). Por contraste con las aproximaciones que intentaron aumentar la producción de IgM mediante la introducción de genes de inmunoglobulina heterólogos o modificados de otro modo en un animal, la presente invención proporciona una solución alternativa proporcionando un animal Tg que comprende un constructo genético que provee una actividad potenciada de FcRn, animal que produce a su vez niveles elevados de IgM endógena en respuesta a un antígeno.

40 Tal como se emplea aquí, el término “respuesta inmune humoral” se refiere a un proceso de los organismos vivos donde se producen anticuerpos en respuesta a moléculas y organismos, los cuales neutralizan y/o eliminan finalmente. La especificidad de la respuesta de los anticuerpos es mediada por células T y/o B mediante receptores asociados a membrana que se unen al antígeno de una sola especificidad. Después de la unión de un antígeno apropiado y la recepción de varias otras señales de activación, los linfocitos B se dividen, lo que produce células B de Memoria, así como a la diferenciación terminal en clones de células plasmáticas secretoras de anticuerpos, produciendo cada uno anticuerpos que reconocen el epítipo antigénico idéntico al igual que también lo reconocía su receptor antigénico. Los linfocitos B de Memoria permanecen durmientes hasta que son activados posteriormente por su antígeno específico. Estos linfocitos proporcionan la base celular de la memoria y la potenciación resultante en la respuesta del anticuerpo cuando se vuelven a exponer a un antígeno específico.

50 Con referencia a la respuesta inmune humoral, el término “potenciado” se refiere a una respuesta inmune en la que el nivel y la policlonalidad de los anticuerpos producidos en respuesta a determinado antígeno son significativamente más altos, o el desarrollo de dicha respuesta inmune es significativamente más rápida, o la respuesta inmune es más resistente en respuesta a determinado antígeno, en comparación con las mismas características de los anticuerpos producidos en respuesta a determinado antígeno o a la respuesta inmune cuando un animal de control de la misma especie está en contacto con el mismo antígeno.

60 Tal como se emplea aquí, el término “inmunización” se refiere a un proceso por el cual se expone un individuo a un agente, a menudo combinado con adyuvantes, que está diseñado para fortificar su sistema inmune frente a aquel agente. El agente se denomina “inmunógeno” o “antígeno”. La inmunización coincide con la inoculación y la vacunación

en que la inoculación y la vacunación utilizan un agente infeccioso viable como lo hace la inmunización. Además del proceso inicial de inmunización, se ha descubierto que la eficacia de las inmunizaciones puede mejorar mediante inyecciones repetitivas periódicas del agente, lo que se denomina inmunización “de refuerzo”.

Con referencia a la inmunización, la expresión “niveles elevados” de inmunoglobulina se refiere a una concentración de inmunoglobulina sérica específica que es significativamente más alta que el nivel de la misma inmunoglobulina específica en el suero de un animal de control de la misma especie, según se mide por la fuerza de la respuesta inmune, por ejemplo, según determina el título máximo de anticuerpos que resulta de ello. Este nivel elevado es normalmente al menos un 50% más alto, preferentemente un 75% más alto, particularmente un 100% más alto, especialmente un 150% más alto.

El resultado de una inmunización depende principalmente de la naturaleza del antígeno. Es ampliamente aceptado que cualquier sustancia que pueda obtener una respuesta inmune sea calificada como inmunogénica y se denomina inmunógeno. Existe una clara distinción operacional entre un inmunógeno y un antígeno. Un antígeno se define como cualquier sustancia que pueda unirse a un anticuerpo específico. Por tanto, todos los antígenos tienen la capacidad de obtener anticuerpos específicos, pero algunos necesitan estar fijados a un inmunógeno para hacerlo. Esto significa que aunque todos los inmunógenos son antígenos, no todos los antígenos son inmunogénicos. Los antígenos utilizados con más frecuencia en inmunología experimental son proteínas y los anticuerpos a proteínas son de enorme utilidad en biología y en medicina experimental. Las proteínas purificadas, sin embargo, no son siempre altamente inmunogénicas y, para provocar una respuesta inmune, tienen que administrarse con un adyuvante. Los carbohidratos, ácidos nucleicos y demás tipos de moléculas son todos antígenos potenciales, pero a menudo sólo inducen una respuesta inmune cuando se fijan a un portador proteico. Así, la inmunogenicidad de los antígenos proteicos determina el resultado virtualmente de cada respuesta inmune. La vía por la que se administra el antígeno afecta tanto a la magnitud como al tipo de respuesta inmune obtenida. Las vías más comunes a través de las que se introducen antígenos en el cuerpo son inyección en el tejido mediante inyección o transfusión subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal. La administración oral proporciona antígenos en el tracto gastrointestinal, mientras que la administración intranasal o inhalación aporta antígenos en el tracto respiratorio.

Los anticuerpos pueden reconocer como antígenos casi cada tipo de molécula biológica, incluyendo metabolitos intermedios simples, azúcares, lípidos, autacoides y hormonas, así como macromoléculas tales como carbohidratos complejos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Sin embargo, sólo las macromoléculas son capaces de estimular los linfocitos B para iniciar las respuestas inmunes humorales. Pequeños químicos, como dinitrofenol, pueden unirse a los anticuerpos, pero no pueden activar las células B por su cuenta (es decir que no son inmunogénicos). Para generar anticuerpos específicos de estos pequeños químicos, normalmente los inmunólogos los fijan a macromoléculas antes de la inmunización. En estos casos, el pequeño químico se llama “hapteno” y la macromolécula se llama portador. El complejo hapteno-portador, a diferencia del hapteno libre, puede actuar como inmunógeno (Abbas y Lichtman, 2003). Protocolos de inmunización similares y diferentes son bien conocidos en la técnica y la selección de la estrategia apropiada será determinada fácilmente por el especialista reduciendo la invención a la práctica.

Normalmente, la respuesta inmune primaria sólo resulta en un ligero aumento no significativo tanto del nivel de anticuerpos específicos producidos frente al inmunógeno/antígeno introducido, como de los niveles totales de inmunoglobulina. La magnitud de la respuesta inmune depende de la dosis de inmunógeno administrado. Por debajo de cierta dosis umbral, la mayoría de las proteínas no obtienen ninguna respuesta inmune. Por encima de la dosis umbral, aparece un incremento progresivo en la respuesta a medida que aumenta la dosis de antígeno hasta alcanzar un amplio nivel de meseta, seguido de una disminución a dosis muy altas de antígeno. En general, las respuestas inmunes secundarias y posteriores tienen lugar a dosis más bajas de antígeno y alcanzan valores de meseta más altos, lo que es una muestra de memoria inmunológica. Esta es la razón por la que normalmente es necesaria una inmunización de refuerzo para lograr títulos significativamente elevados del anticuerpo específico. El número de inmunizaciones de refuerzo puede variar de acuerdo con varios factores, tales como la inmunogenicidad del antígeno, el tipo de adyuvante inmunológico, la vía y el programa de inmunización (Stills, 2005).

Debido a que la mayoría de los antígenos son muy complejos, presentan numerosos epítomos que son reconocidos por un gran número de linfocitos. Cada linfocito se activa para proliferar y diferenciarse en células plasmáticas, y la respuesta del anticuerpo resultante es un anticuerpo policlonal (PABs). Una característica importante de la respuesta inmune adaptativa es la memoria inmunológica. La memoria inmunológica se produce como resultado de la inmunización inicial o primaria, lo que provoca la respuesta inmune primaria.

La mayoría de las proteínas son poco o nada inmunogénicas cuando se administran por sí mismas. Fuertes respuestas inmunes adaptativas a los antígenos proteicos requieren siempre inyectar el antígeno en una mezcla conocida como adyuvante. Un adyuvante es cualquier sustancia que potencia la inmunogenicidad de las sustancias mezcladas con él. Los adyuvantes difieren de los portadores proteicos en que no forman enlaces estables con el inmunógeno. Al cebado con un adyuvante, los inmunógenos -incluso un inmunógeno que produce una respuesta débil o incluso ninguna respuesta- producirán una respuesta inmune sustancial cuando se administra una dosis de refuerzo de inmunógeno de adyuvante obligado en ausencia de adyuvante (Janeway Jr. y col., 2001; Leenaars y Hendriksen, 2005; Lipman y col., 2005; McCullough y Summerfield, 2005; Schunk y Macallum, 2005; Stills, 2005).

La respuesta a cada inmunización es cada vez más intensa, de modo que las respuestas secundarias, terciarias y posteriores son de magnitud cada vez mayor. El reto repetitivo con el antígeno para conseguir un estado elevado de inmunidad se conoce como hiperinmunización. Muchos de los anticuerpos utilizados en técnicas clínicas e inmunoquímicas son anticuerpos policlonales causados por la hiperinmunización de un animal adecuado, por ejemplo un roedor, conejo, cabra, burro u oveja, con una suspensión del antígeno apropiado. Se cosecha el suero en el punto máximo de producción de anticuerpos y con este método se pueden obtener concentraciones específicas de inmunoglobulina G (IgG) de aproximadamente 1 a 10 mg/ml en suero. Aunque se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales (mAbs) son una fuente de baja inmunogenicidad bien caracterizada y una herramienta muy eficaz, sigue habiendo un lugar para los anticuerpos policlonales. Como el sistema inmune natural utiliza anticuerpos policlonales más que anticuerpos mAbs para responder a los patógenos, los anticuerpos policlonales pueden resultar también preferibles en muchos casos para la inmunoterapia pasiva. Las ventajas de los anticuerpos policlonales incluyen su fuerza potencialmente incrementada en la formación del complejo inmune, su utilidad para combatir enfermedades infecciosas causadas por distintas cepas de patógenos o que requieren la neutralización de múltiples epítomos para un tratamiento con éxito. Los anticuerpos policlonales son también ventajosos en las técnicas inmunoquímicas, ya que son, en general, relativamente fáciles de elaborar y su producción es más barata. Asimismo, los anticuerpos policlonales se pueden generar en una variedad de especies, incluyendo conejo, cabra, oveja, burro, pollo y otros, dando a los usuarios muchas opciones en el diseño experimental. Sin embargo, a veces la cantidad de anticuerpos específicos en una preparación policlonal representa solamente una fracción de minuto de la proteína para anticuerpos total. Por tanto, la meta esencial de la producción de anticuerpos con estos propósitos consiste en obtener antisueros de alto título, alta afinidad.

En los protocolos de hiperinmunización ampliamente utilizados en la técnica son necesarias inmunizaciones de refuerzo regulares para mantener un alto nivel de IgG, ya que el catabolismo de la inmunoglobulina aumenta en los animales normales, tal como se había demostrado ya en estudios del metabolismo de la IgG (Andersen y Bjorneboe, 1964). Por el contrario, la presente invención proporciona un protocolo más eficaz para lograr niveles establemente elevados de producción de inmunoglobulina, donde los altos niveles de IgG se conservan durante un tiempo relativamente largo sin más inmunización o inmunización menos frecuente.

En la producción de anticuerpos policlonales se puede identificar un número de etapas críticas que pueden influir en el resultado del experimento con animales, tales como resultados inmunológicos y de dolor y sufrimiento de los animales. Cuando el antígeno con el que los anticuerpos deben ser producidos es poco inmunogénico, el sistema inmune requiere un estímulo para inducir una respuesta inmune eficaz. Se pueden utilizar con este propósito adyuvantes y se puede dirigir la respuesta inmune frente a una respuesta más celular o humoral. Aunque se han descrito más de 100 adyuvantes, se utilizan de forma rutinaria sólo algunos para la producción de anticuerpos policlonales (por ejemplo adyuvante completo de Freund (FCA); adyuvante incompleto de Freund, sales de aluminio, Quil A, Iscoms, Montanide, TiterMax™, y RIBI™, etc.). con frecuencia se emplea FCA para la producción de anticuerpos policlonales, debido a que se inducen altos títulos de anticuerpos en casi todos los tipos de antígenos. Sin embargo, muchos investigadores han reportado efectos secundarios graves después de la inyección, por ejemplo, de los adyuvantes FCA, TiterMax y RIBI. La gravedad de los cambios patológicos depende no sólo del adyuvante sino también del tipo de antígeno utilizado. Además, a menudo los adyuvantes alternativos no inducen respuestas eficaces de los anticuerpos. Se ha descubierto que el volumen inyectado tiene un efecto adicional sobre el alcance de las lesiones producidas (Leenaars y Hendriksen, 2005). En base a estos factores, la presente invención proporciona un protocolo más eficaz que permite la inmunización menos frecuente, lo que es una gran ventaja en términos del bienestar del animal, más allá del valor económico, ya que este protocolo reduce el dolor y el agotamiento de los animales obteniendo al mismo tiempo respuestas inmunes óptimas.

En consecuencia, la presente invención proporciona un método tal como se reivindica, para producir inmunoglobulinas policlonales, el cual comprende la utilización de un animal Tg que incluye un constructo genético que prevé la actividad potenciada del FcRn de acuerdo con cualquier protocolo establecido de inmunización que permita la producción de inmunoglobulinas policlonales. El animal transgénico se obtiene preferentemente de una cepa útil para la producción de anticuerpos policlonales o se modifica genéticamente para ser más adecuado para la producción de anticuerpos policlonales.

Por contraste con los PAbs, los anticuerpos monoclonales (MAbs) son anticuerpos producidos por un único clon de linfocitos B. A mediados de los 70, Köhler y Milstein idearon una técnica para generar anticuerpos monoclonales de una especificidad deseada, por lo que se les concedió el premio Nóbel (Kohler y Milstein, 1975). Tras décadas de práctica y experimentos acumulados en el campo de los MAbs, un experto medio en la técnica debería ser adecuadamente competente en todos los aspectos de la producción de anticuerpos monoclonales. Para producir un anticuerpo monoclonal específico de un antígeno definido se inmuniza un ratón, una rata o un conejo con un antígeno, y las células B se pueden utilizar como esplenocitos, linfocitos en los nódulos linfáticos u otros linfocitos de sangre periférica o linfocitos de otro tejido del animal. El huésped mamífero puede someterse a inmunizaciones adicionales para potenciar aún más la población de células B específicas del antígeno deseado, así como la especificidad del antígeno. Estas células B aisladas se fusionan después con una línea celular inmortalizada adecuada. Las líneas de mieloma son los mejores socios de fusión para las células B, debido a que las células de mismo tipo tienden a fusionarse y dar lugar a híbridos estables de forma más eficaz que células diferentes. La célula inmortal es una célula linfoblastoide o una célula de plasmacitoma, tal como una célula de mieloma, que es una célula productora de

anticuerpos y es maligna. Los sobrenadantes de los hibridomas se criban para seleccionar hibridomas óptimos con las propiedades convenientes de unión al antígeno. Los hibridomas seleccionados se clonan y se crío-conservan.

En este contexto, con respecto a los anticuerpos monoclonales, el término “animal” se refiere a cualquier mamífero no humano, incluyendo, pero sin limitarse a, conejos, ratones, ratas, cabras, ovejas, cobayas, cerdos y vacas.

5 Además de las técnicas convencionales o clásicas, la utilización de tecnologías recombinantes ha iniciado una nueva era en la producción de anticuerpos monoclonales y policlonales, considerando ahora los anticuerpos industriales (por ejemplo, la reducción del anticuerpo a su tamaño funcional o la elaboración de anticuerpos humanizados) (Lonberg, 2005; Peterson, 2005).

10 En consecuencia, la presente invención proporciona un método tal como se reivindica o la producción de inmunoglobulinas monoclonales, que comprende la utilización de un animal Tg que incluye un constructo genético que proporciona una actividad potenciada de FcRn de acuerdo con cualquier protocolo establecido de inmunización, permitiendo la producción de inmunoglobulinas monoclonales. El mamífero no humano transgénico se obtiene preferentemente a partir de una cepa útil para la producción de anticuerpos monoclonales o que se ha modificado genéticamente para ser más adecuado para la producción de anticuerpos monoclonales.

15 Tal como se utiliza aquí, el término “transgénico” dentro del contexto de la expresión “animal transgénico” se refiere a un animal no humano que contiene un gen u otra secuencia de ácido nucleico que no se obtendría mediante la reproducción normal o por prácticas de apareamiento. El término “gen” se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa ARNm, ARN funcional o una proteína específica, incluyendo secuencias reguladoras. El término “gen nativo” se refiere a un gen tal como se encuentra en la naturaleza. Un “transgén” se refiere a un gen que ha sido introducido en el
20 genoma mediante su transformación y que se mantiene de forma estable. En este contexto, el término “transformación” se emplea aquí en sentido amplio para introducir ADN extraño en una célula. El término significa también que cubre otros métodos funcionales equivalentes para introducir ADN extraño en una célula, por ejemplo microinyección, transfección, infección, transducción o fusión de una célula donante y una célula aceptora. Los transgenes pueden incluir, por ejemplo, genes heterólogos u homólogos a los genes de un animal particular a ser transformado. Además,
25 los transgenes pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo o genes quiméricos. El término “gen endógeno” se refiere a un gen nativo en su emplazamiento natural en el genoma de un organismo.

Generalmente la introducción de un transgén en un animal receptor se lleva a cabo utilizando un constructo genético que porta el transgén de interés. Tal como se emplea aquí, el término “constructo genético” significa la
30 inclusión de un ADN recombinante creado artificialmente que comprende secuencias de ácido nucleico que, a su introducción en la célula receptora, proporciona la expresión de dichas secuencias de ácido nucleico introducidas. Un constructo genético puede comprender secuencias codificadoras y reguladoras. El término “secuencia codificante” se refiere a una secuencia de ADN o ARN que codifica para una secuencia específica de aminoácido y excluye las secuencias no codificantes. El término “secuencias reguladoras” se refiere a secuencias de nucleótidos localizadas aguas arriba (secuencias no codificantes 5'), dentro o aguas abajo (secuencias no codificantes 3') de una secuencia
35 codificante y que influyen en la transcripción, el procesamiento o la estabilidad del ARN, o en la traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras incluyen potenciadores, promotores, secuencias líder de traducción, intrones y secuencias de señal de poliadenilación. Incluyen secuencias naturales y sintéticas, así como secuencias que pueden ser una combinación de secuencias sintéticas y naturales. Algunas secuencias reguladoras útiles en la presente invención incluirán, pero no se limitan a, promotores constitutivos, promotores específicos de tejidos, promotores específicos de la etapa de desarrollo, promotores inducibles y promotores virales.
40

El término “promotor” se refiere a una secuencia de nucleótidos, normalmente aguas arriba (5') de su secuencia codificante, que controla la expresión de la secuencia codificante, proporcionando el reconocimiento para la ARN polimerasa y otros factores necesarios para una transcripción apropiada. El término “promotor” incluye un promotor mínimo, que es una secuencia corta de ADN compuesta normalmente de una caja-TATA y otras secuencias que sirven
45 para especificar el sitio del comienzo de transcripción, al que se añaden elementos reguladores para controlar la expresión. “Promotor” se refiere asimismo a una secuencia de nucleótidos que incluye un promotor mínimo más elementos reguladores que son capaces de controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. Este tipo de secuencia promotora consiste en elementos próximos y más distales aguas arriba, denominándose estos últimos elementos potenciadores. En consecuencia, un “potenciador” es una secuencia de ADN que puede estimular la
50 actividad del promotor y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para potenciar el nivel o la especificidad del tejido de un promotor. Es capaz de funcionar en ambas orientaciones (normal o volteada), y es capaz de funcionar incluso cuando se desplaza aguas arriba o aguas abajo del promotor. Ambos potenciadores y otros elementos del promotor aguas arriba se unen a las proteínas de unión a ADN específicas de la secuencia que median sus efectos. Los promotores pueden proceder en su totalidad de un gen nativo o estar compuestos de distintos
55 elementos derivados de distintos promotores encontrados en la naturaleza, o incluso compuestos de segmentos de ADN sintéticos. Un promotor puede contener también secuencias de ADN que están implicadas en la unión de factores proteicos que controlan la eficacia del comienzo de la transcripción en respuesta a condiciones fisiológicas o de desarrollo. La regulación de la transcripción puede depender también de la presencia de distintos agentes químicos, hormonas, inductores y similares. El especialista en la técnica podrá fácilmente seleccionar y reunir las secuencias
60 reguladoras más adecuadas para la aplicación específica.

La tecnología transgénica ha sido ampliamente utilizada en la investigación científica y se han establecido varios protocolos diferentes. Aunque existen varios informes en la técnica sobre las limitaciones de las técnicas transgénicas convencionales, los niveles de expresión transgénica varían entre las líneas (Palmiter y col., 1984) y a veces incluso entre animales y la misma línea (Dobie y col., 1996; Sutherland y col., 2000), particularmente cuando se utiliza ADNc más que fragmentos genómicos. La expresión transgénica variegada depende de los sitios de integración de los transgenes en los genomas huésped y compromete la expresión transgénica (Opsahl y col., 2003). Las limitaciones de la microinyección de transgenes basados en plásmidos pueden ser superadas mediante la utilización de sistemas de clonación que adaptan el ADN en submegabases, tales como YACs (cromosoma artificial de levadura), BACs (cromosoma artificial bacteriano) o PAC (cromosoma artificial derivado del fago P1). Estas técnicas están bien probadas en la generación de ratones Tg (revisado por Giraldo y Montoliu, 2001). El especialista podrá llevar a cabo las etapas necesarias para la producción y caracterización del animal Tg descrito aquí basándose en el estado de la técnica y las enseñanzas proporcionadas aquí.

En una realización preferente, el constructo genético aquí descrito comprende el inserto del clon BAC bovino #128E04. El clon BAC #128E04 es un clon procedente de una librería BAC bovina obtenida a partir de ADN procedente del repliegue genital de un feto macho de un toro Holstein de alto rango (obtenido de la librería BAC bovina de INRA, Eggen y col., 2001). El inserto del clon #128E04 se define como un segmento del cromosoma 18 del genoma bovino entre las posiciones nucleotídicas 53543852 y 53652024 tal como se presenta en el NCBI Map Viewer, corriente *Bos taurus* (vaca) Build 3.1 (basado en Btau 3.1) a 11 de agosto de 2007.

En una realización preferente, el constructo genético aquí descrito comprende el inserto del clon BAC de conejo #262E02. Se aisló el clon BAC #262E02 de una librería BAC de conejo (Rogel-Gaillard y col., 2001). Se construyó la librería BAC en el vector pBeloBAC11, se preparó un ADN de alto peso molecular a partir de glóbulos blancos de un conejo de Nueva Zelanda. La librería BAC de conejo es manipulada por el centro de recursos del INRA para animales domésticos y está disponible al público.

La modificación específica presente en el animal Tg descrito aquí prevé la sobreexpresión de un gen que codifica la cadena- α de una proteína con actividad de FcRn. Tal como se emplea aquí, el término "sobreexpresión" se refiere a niveles de expresión que son superiores a los esperados de las dos copias genómicas del gen de interés en determinada especie. La sobreexpresión puede evaluarse a varios niveles de los procesos bioquímicos, por ejemplo a nivel de transcripción, traducción, modificaciones post-translationales, etc., hasta donde el nivel elevado de expresión resulta en cambios detectables en la función de FcRn en comparación con la expresión del nivel básico en el animal de tipo salvaje. Por ejemplo, la proteína codificada por un gen de interés se puede expresar en una cantidad en aumento, como en varios ejemplos descritos aquí, la cadena- α de una proteína con actividad de FcRn se sintetiza a altos niveles.

La sobreexpresión se puede conseguir mediante diversos medios diferentes bien conocidos por el especialista en la técnica de la biología molecular. Los ejemplos de formas de sobreexpresión de un gen de interés consisten en incrementar el número de copias del gen o en incrementar la fuerza de unión de la región promotora o en sobreregular los elementos potenciadores, o a la inversa inhibir o bloquear los elementos represores, y similares.

En los animales transgénicos preferentes descritos aquí, la sobreexpresión es independiente del sitio de integración y es dependiente del número de copias integradas. Sin embargo, el especialista en la técnica podrá determinar cuándo es ventajoso o necesario utilizar uno cualquiera de los elementos genéticos disponibles para conseguir la expresión limitada del transgén. Los ejemplos de elementos reguladores inducibles, así como de los elementos reguladores dependientes de los tejidos, órganos, etapa de desarrollo, etc., que permiten la expresión sintonizada precisa del gen de interés son abundantes en la técnica anterior y están a la disposición del especialista en la materia.

Tal como se describe aquí, la sobreexpresión se puede obtener mediante la integración de más de una copia funcional del gen de interés en el genoma del animal Tg de la invención. Preferentemente, los fragmentos de ADN que contienen un gen de cadena- α de FcRn se toman de los animales. Dichos grandes fragmentos de ADN pueden ser aislados cribando una librería de cósmidos, YACs o BACs y similares, preparados a partir del ADN genómico del animal no humano. Los clones YAC pueden llevar fragmentos de ADN de hasta 2 megabases, los clones BAC son capaces de llevar fragmentos de ADN de tamaño más pequeño (aproximadamente 150 - 250 kb). El animal de origen puede ser de cualquier especie, por ejemplo uno que desempeñe un papel significativo en la producción comercial de anticuerpos monoclonales o policlonales, tales como ratón, rata, conejo, oveja, cabra, bovino, cerdo, burro y caballo. Está claro que la selección del origen del transgén no es limitativa y la conveniencia del gen en los métodos de acuerdo con la presente invención puede ser comprobada por el especialista en la técnica en base a la enseñanza aportada aquí.

Los procedimientos para introducir el transgén en el animal receptor y para la selección de animales Tg son bien conocidos por el especialista. Brevemente, los vectores transgénicos que llevan un gen de cadena- α de FcRn son introducidos en la célula o células receptoras y luego son integrados en el genoma de la célula o células receptoras mediante integración al azar o integración dirigida. Para la integración al azar, un vector transgénico que contiene un locus de FcRn se puede introducir en una célula receptora de un animal mediante tecnologías transgénicas estándar. Por ejemplo, un vector transgénico se puede inyectar directamente en el pronúcleo de un ovocito fertilizado. Un vector transgénico se puede introducir también mediante la co-incubación de esperma con el vector transgénico antes de la fertilización del ovocito. Los animales transgénicos se pueden desarrollar a partir de ovocitos fertilizados.

Otra forma de introducir un vector transgénico es la transgénesis lentiviral. Este método desarrollado recientemente -aunque esté restringido en términos de tamaño del transgén- demostró ser muy eficaz en la creación de animales Tg en un número de especies, por ejemplo ratones, ratas, cerdos, y es una herramienta especialmente prometedora en el desarrollo de estrategias de terapia genética (Pfeifer, 2006). Otra forma para introducir un vector transgénico es mediante transfección de células madre embrionarias y posterior inyección de las células madre embrionarias modificadas genéticamente en los embriones en desarrollo. Finalmente, los animales Tg quiméricos se producen a partir de embriones que contienen el transgén de FcRn integrado en el genoma de al menos algunas células somáticas del animal Tg. Para la integración dirigida, un vector transgénico se puede introducir en células receptoras apropiadas de animal, tales como las células madre embrionarias o las células somáticas ya diferenciadas.

En realizaciones específicas, la integración del transgén puede resultar en la pérdida del locus endógeno correspondiente de la cadena- α de FcRn mediante procedimientos de recombinación homóloga. Alternativamente, el locus nativo de FcRn puede ser noqueado independientemente de la introducción del transgén. Por ejemplo, se puede obtener el animal deseado mediante prácticas clásicas de reproducción y apareamiento utilizando padres con genotipos noqueados. Sin embargo, la sustitución del locus endógeno de FcRn no es necesaria para alcanzar el objeto de la invención. El especialista en la técnica podrá determinar si la presencia del gen endógeno es perjudicial para la alta producción de inmunoglobulina. Sin embargo, cuando múltiples copias del gen que codifica la cadena- α de una proteína con actividad de FcRn se insertan para obtener la sobreexpresión del gen, en circunstancias normales, no se plantea ninguna necesidad de dicha estrategia de sustitución.

Si existe la necesidad de enriquecer un isotipo específico de IgG que se una más estrechamente al FcRn a partir de una cadena- α exógena de FcRn en lugar de sus homólogos endógenos, entonces es preferible suprimir (noquear) el FcRn endógeno y/o sustituirlo por la cadena- α exógena de FcRn. Un ejemplo importante es la sobreproducción de IgG humana en animales Tg que llevan el ADN cromosomal humano que codifica la cadena pesada y ligera de los genes humanos de inmunoglobulina. Es previsible que en animales la sobreexpresión por ejemplo de la cadena- α de FcRn bovino y la supresión de la cadena- α de FcRn huésped sean ventajosas para enriquecer la IgG humana a costa de la IgG del huésped, que se une más débilmente a la cadena- α exógena de FcRn, y, por tanto, se elimina más rápidamente del animal. Un ejemplo similar es cuando se prefiere uno de los isotipos de IgG huésped para enriquecer a costa de los otros isotipos de IgG.

Las células seleccionadas entonces pueden fusionarse con células unitarias enucleadas de transferencia nuclear, por ejemplo ovocitos. La fusión se lleva a cabo de acuerdo con técnicas convencionales bien establecidas (véase por ejemplo Cibelli y col., 1998). La enucleación de ovocitos y la transferencia nuclear se pueden llevar a cabo también mediante microcirugía utilizando pipetas de inyección (véase por ejemplo Wakayama y col., 1998). Las células huevo resultantes se cultivan entonces en un medio apropiado y se transfieren a receptores sincronizados para generar animales Tg. Alternativamente, las células madre embrionarias genéticamente modificadas seleccionadas pueden inyectarse en embriones en desarrollo, que se desarrollan posteriormente en animales quiméricos.

Se describe también un animal transgénico no humano donde el animal Tg contiene múltiples copias del transgén. Teóricamente no existe límite planteado con respecto al número de copias del transgén introducido en el animal Tg. El especialista en la técnica podrá determinar fácilmente si la sobreexpresión del gen que codifica la cadena- α de una proteína con actividad de FcRn proporciona una expresión relativamente alta de FcRn para proporcionar los efectos ventajosos de la invención pero no tienen la expresión peligrosamente intensa del gen que perjudicaría la homeostasis celular y la funcionalidad. En los ejemplos presentados aquí no se observaron modificaciones fenotípicas entre las distintas líneas Tg de animales que incluyen hasta 10 copias del gen bFcRn completo (Bender y col., 2007). Además, Lu y col. (Lu y col., 2007) presentaron datos para las líneas Tg que contenían hasta 15 copias de ADNc de bFcRn bajo un promotor específico de las glándulas mamarias sin modificaciones fenotípicas significativas.

Tal como se emplea aquí, el término "actividad de FcRn" se utiliza para indicar una serie de eventos que tienen lugar *in vivo*. Tal como se ha expuesto ya durante la descripción del estado de la técnica, se ha identificado primero el FcRn en roedores como receptor que transfiere las inmunoglobulinas maternas de la madre al recién nacido a través del intestino neonatal, y luego unos estudios demostraron que el FcRn desempeña un papel esencial en la regulación del transporte de IgG dentro y a través de células de diverso origen. Dentro del contexto de la presente descripción, el término "actividad de FcRn" se refiere principalmente al rescate de la IgG de la degradación. En consecuencia, la actividad de FcRn, según se utiliza aquí, se define como la capacidad para unir la IgG-Fc y proteger la IgG contra la degradación.

Además, tal como se indicó primero aquí, el término "actividad de FcRn" según se utiliza aquí, se refiere también a la capacidad de FcRn para potenciar la respuesta inmune humoral, más específicamente para potenciar la expansión clonal de la célula B específica del antígeno y, consecuentemente, la síntesis de IgM e IgG.

Puede determinarse la actividad de FcRn, por ejemplo, en una o varias etapas del proceso de rescate de IgG, cuyo mecanismo se piensa que es mediado principalmente por las células endoteliales que forran los vasos sanguíneos. Dentro de estas células, el FcRn reside predominantemente en endosomas tempranos/de reciclaje, donde encuentra la IgG internalizada por la endocitosis en fase fluida. El ambiente ácido de los endosomas facilita la interacción. La IgG y la albúmina unidas se vuelven a reciclar en la superficie y se liberan de la célula, mientras los ligandos no unidos van y vienen aguas abajo hacia la degradación lisosomal.

Algunas de las etapas, sin embargo, pueden ser modeladas y definidas independientemente del significado general del término.

La capacidad de unión de una IgG de interés o de moléculas que comprenden un dominio constante de IgG o un fragmento Fc de la misma a FcRn puede ser caracterizada por diversos ensayos *in vitro*. La WO 97/34631 describe detalladamente varios métodos.

Un método para la determinación de la unión entre IgG y FcRn es un ensayo *in vitro* que utiliza un complejo aislado de FcRn y $\beta 2m$ que conserva la función *in vivo* de la unión IgG-Fc a un pH aproximado de 6, teniendo lugar la liberación de IgG-Fc unido al cambiar el pH hasta aproximadamente un pH de 7,2. El término "aproximadamente" tal como se emplea aquí con referencia al pH se refiere al $pH \pm 0,2$. El complejo FcRn/ $\beta 2m$ está unido a un soporte sólido tal como un pocillo de microtítulo, un filtro, una membrana, una columna o perlas. Los materiales comúnmente empleados para el soporte sólido son nylon, poliestireno, polipropileno y agarosa. En general, el contacto de los componentes moleculares se consigue mediante la adición de los componentes conjuntamente en solución acuosa, normalmente tamponada adecuadamente, y dejando que los componentes reaccionen entre sí durante un período de tiempo predeterminado. Según el plan de ensayos, pueden resultar necesarias etapas de lavado entre las adiciones de los distintos componentes. Estos componentes sirven para determinar la unión que está teniendo lugar entre los componentes, y puede establecerse de acuerdo con diversos protocolos de ensayo bien conocidos, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de unión directa, ensayos sándwich y similares. Tras producirse todas las etapas necesarias de unión, la detección se lleva a cabo mediante las técnicas normalmente empleadas, por ejemplo mediante la detección de una señal que puede ser radiactiva, enzimática, fluorescente u otra señal bien conocida. La señal medida es proporcional a la señal medida (tal como en los ensayos de unión directa) o competitiva.

El método generalizado para determinar la unión entre IgG y FcRn se puede adaptar adecuadamente para identificar la cadena- α apropiada de FcRn y/o el par de $\beta 2m$ que forma el heterodímero ideal de FcRn de unión a la IgG de interés. En este caso, en la prueba se utiliza la cadena- α de FcRn derivada de distintas especies, o el resultado de una mutación, y una $\beta 2m$ que se une con una mayor afinidad a la IgG de interés. En primer lugar, una IgG conocida por unirse a FcRn (por ejemplo, la IgG humana al bFcRn) se utiliza en condiciones apropiadas para la unión. Este plan inicial es seguido de experimentos en los que la cadena- α original de FcRn será sustituida por la cadena- α de FcRn de una especie diferente o generada por mutagénesis *in vitro* y se someterá entonces a ensayo la unión a la IgG en cuestión. La mejor cadena- α de FcRn se puede identificar mediante la comparación de la afinidad de unión del complejo con el complejo original de unión. Se podría utilizar un método similar para encontrar la mejor posible para emparejarse con una cadena- α de FcRn predeterminada. Alternativa o adicionalmente se pueden emplear técnicas de alto rendimiento para ensayar simultáneamente varios pares de combinaciones de cadena- α de FcRn y $\beta 2m$. El complejo aislado de FcRn y $\beta 2m$, que conserva la función *in vivo* de la unión de IgG-Fc, es producido preferentemente mediante síntesis *in vitro* a partir de ácidos nucleicos contruidos que codifican las proteínas respectivas. Las proteínas se pueden sintetizar separadamente y luego ser añadidas conjuntamente para producir el complejo. Los segmentos de ADN que codifican estas proteínas se pueden incorporar en un vector recombinante en una posición tal que el vector se convierta en capaz de expresar una proteína. Las técnicas para la manipulación de segmentos de ADN de esta forma, por ejemplo, mediante constructos genéticos por endonucleasas de restricción, serán reconocidas por los especialistas en la técnica a la luz tanto de la presente descripción como de referencias tales como Ausubel y col., 1998. Los especialistas en la técnica reconocerán que existen métodos adicionales que se pueden utilizar para producir un complejo adecuado para el método *in vitro* descrito directamente más arriba. Alternativamente, componentes endógenos complejos se pueden aislar de una fuente celular apropiada.

La afinidad de una IgG de interés por FcRn se puede medir mediante la medición por resonancia de plasmón superficial (SPR) utilizando, por ejemplo, un BIAcore 2000 (BIAcore Inc.) tal como se ha descrito anteriormente (Karlsson y col., 1991; Popov y col., 1996). En este método, las moléculas de FcRn se acoplan a un chip sensor BIAcore (por ejemplo, chip CM5 de Pharmacia) y la unión de la IgG a petición del FcRn inmovilizado se mide a cierto caudal para obtener sensogramas con el software 2.1 de evaluación B1A en base a qué velocidad máxima-mínima de la IgG es solicitada, se pueden calcular los dominios constantes o fragmentos de la misma con respecto a FcRn.

Las afinidades relativas de la IgG de interés o de fragmentos de la misma por FcRn se pueden medir también por ejemplo mediante un ensayo de unión competitiva. La IgG de interés se añade en distintas cantidades a los pocillos de una placa de 96 pocillos en la que se inmoviliza el FcRn. Entonces se añade a cada pocillo una cantidad constante de IgG radiomarcada. Se dibuja la radioactividad porcentual de la fracción unida en función de la cantidad de IgG de tipo salvaje y su afinidad relativa se puede calcular a partir de la pendiente de la curva. Además, las afinidades de la IgG de interés o de fragmentos de la misma por FcRn se pueden medir también mediante estudios de saturación y análisis Scatchard o por otros medios, por ejemplo cálculos de regresión no lineal (ajuste de curvas).

La transferencia de la IgG solicitada o de fragmentos de la misma a través de la célula por FcRn se puede medir mediante un ensayo de transferencia *in vitro* utilizando IgG radiomarcada o fragmentos de la misma y células que expresan el FcRn y mediante la comparación de la radioactividad de un lado de la monocapa celular con la del otro lado.

Otro ensayo para identificar el FcRn de la IgG protectora *in vivo* es un ensayo de cultivo celular. Las células de mamíferos que expresan funcionalmente FcRn en cultivo son generadas o identificadas a partir de células preexistentes de mamíferos. Las células adecuadas para su utilización en este ensayo son capaces de catabolizar la IgG, la expresión

del FcRn en estas células provocan una disminución del catabolismo. La expresión funcional del FcRn tal como se menciona en el contexto de un ensayo *in vivo* indica que los complejos de la cadena- α de FcRn con $\beta 2m$ se unen a una IgG de interés y protegen la IgG unida contra la degradación. Para identificar la cadena- α de FcRn apropiada, una serie de células que expresan distintas cadenas- α de FcRn y la IgG de interés se pone en contacto con las células. Se incuban las células en condiciones adecuadas y conducentes a la función celular normal, y luego se ensayan en busca del catabolismo de IgG. Una disminución sustancial en el catabolismo de la IgG en las células que expresan el FcRn en comparación con el catabolismo de la IgG en las células de control que no expresan el FcRn es una indicación de que la cadena- α de FcRn candidata protege la IgG contra la degradación. Este ensayo detecta la función de FcRn a través de la unión a la IgG, la internalización y la protección. Se pueden utilizar para el ensayo de cultivo celular líneas celulares conocidas en la técnica, así como células primarias de la especie seleccionada para producir el anticuerpo a su inmunización. Este ensayo es crucial para testar aquellas moléculas híbridas de la cadena- α de FcRn que están compuestas de una parte extracelular superior en la unión de IgG y de una transmembrana y un segmento citoplásmico que es específico de la especie que se utilizará para la inmunización.

Tal como se menciona con respecto a la descripción del estado de la técnica, FcRn es una molécula heterodímera compuesta de una cadena- α de tipo MHC de clase I y una $\beta 2$ -microglobulina ($\beta 2m$). La cadena- α de FcRn (símbolo aprobado: FCGRT, nombre aprobado: receptor Fc, IgG, portador de la cadena alfa, receptor de la inmunoglobulina G de fragmento Fc; receptor Fc neonatal, cadena alfa de FcRn) proporciona a la molécula sus características específicas, mientras que $\beta 2m$ es un componente omnipresente en diversos complejos proteicos diferentes. Es obvio para el especialista en la técnica que, para los métodos de la presente invención, ambas subunidades del heterodímero deben estar presentes en cantidades adecuadas. La característica determinante para producir niveles elevados de inmunoglobulinas de acuerdo con la invención es la sobreexpresión de un gen que codifica la cadena- α de la molécula del FcRn, tal como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, está claro que cantidades equimolares de la otra cadena, $\beta 2m$, son necesarias para producir el FcRn funcional. Por tanto, para la práctica de la invención, el especialista debe tener en cuenta la disponibilidad celular de $\beta 2m$. La correlación entre los niveles esperados del heterodímero FcRn en base a las modificaciones genéticas realizadas en el animal Tg y la actividad medida de FcRn debería ser indicativa de cualquier problema que surja del suministro insuficiente de $\beta 2m$. El especialista en la técnica anterior y en la presente descripción dispone de métodos para evaluar ambos factores. Similarmente, cuando resulta necesario, el nivel de $\beta 2m$ puede ser aumentado por el especialista, por ejemplo utilizando metodologías transgénicas del estado de la técnica. En realizaciones específicas, la presente invención se puede mejorar aún más proporcionando animales Tg que sobreexpresen simultáneamente tanto la cadena- α de FcRn como la cadena de $\beta 2$ -microglobulina a partir y/o mediante constructos genéticos iguales o diferentes.

Como se deriva a partir de la sección anterior que expone la actividad de FcRn, la composición del heterodímero puede ser un factor significativo en la determinación de su actividad. En consecuencia, se contempla también cualquier combinación deseada de la cadena- α y la $\beta 2m$ para obtener el nivel incrementado de inmunoglobulinas en el suero del animal Tg. Las implicaciones de las características de unión y afinidad específica de FcRn se detallan más arriba; sin embargo, estas propiedades del heterodímero FcRn vienen determinadas también por su composición en subunidades. Tal como se expuso en la descripción de la técnica anterior, la fuerza de la unión entre el FcRn bovino y la IgG humana es más alta que entre el FcRn humano y la IgG humana. Por tanto, un aspecto muy importante consiste en proporcionar moléculas de FcRn con características de unión superiores a las de la molécula nativa de FcRn del animal Tg. En particular, esta meta se puede alcanzar mediante la prueba y selección de la mejor combinación posible de la cadena- α y la $\beta 2m$ del FcRn para la producción de inmunoglobulinas en el animal Tg. Esto se puede lograr introduciendo una cadena- α o una $\beta 2m$ adecuada procedente de una especie animal diferente o igual. El especialista en la técnica será capaz de llevar a cabo las modificaciones necesarias en el animal Tg después de haber determinado las características de unión tal como se detalla aquí. En consecuencia, cuando la presente especificación se refiere al animal Tg, se pretende referir a un animal que no sólo incorpora un gen que codifica la cadena- α de una proteína con actividad de FcRn, sino que si es necesario el gen que codifica la cadena- α de una proteína con actividad de FcRn y el gen que codifica la $\beta 2$ -microglobulina.

Se describe también cómo se consigue potenciar la actividad de FcRn mediante la introducción en un animal no humano de un constructo genético que codifica $\beta 2m$. El especialista en la técnica será capaz de determinar las condiciones necesarias para conseguir esta potenciación. Todas las consideraciones expuestas con respecto a la cadena- α del FcRn se aplicarán *mutatis mutandi* a las modificaciones que involucran la $\beta 2$ -microglobulina ($\beta 2m$).

Asimismo se describe cómo utilizar versiones mutantes de la cadena- α o de la $\beta 2m$, siempre que las modificaciones resulten en una molécula funcional de FcRn que cumpla con los requisitos de actividad tal como se han descrito anteriormente. El especialista en la técnica de la biología molecular conoce bien las tecnologías de mutación. Sin embargo, para definir la proteína adecuada de FcRn, en lugar del requisito de actividad, se puede establecer la homología estructural entre la proteína mutante y la nativa. Se recalca aquí que la homología estructural es una característica disponible, pero no limitativa, para caracterizar el transgén. La cadena- α de la proteína de FcRn puede tener una identidad de secuencia del 60% aproximadamente o más con la secuencia de la proteína bovina de FcRn tal como se utiliza en la presente enseñanza. Los términos "identidad de secuencia", "homología" y "variante" se utilizan de forma intercambiable en la presente especificación. Cuando se dice que un aminoácido es homólogo a otro, significa que una de las secuencias de aminoácido en cuestión tiene al menos un 60%, preferentemente al menos un 70%, particularmente al menos un 80%, especialmente al menos un 90%, y de forma todavía más preferente al menos un 95% de identidad de secuencia con la otra secuencia. Para determinar si las secuencias son, digamos, al menos un

60% idénticas, se puede utilizar el programa FastDB de bases de datos EMBL o SWISSPROT. Se pueden utilizar también para la determinación de esta homología otros algoritmos y realizaciones informatizadas de los mismos bien conocidos en la técnica.

En una realización específica, la versión mutante de la cadena- α de la proteína de FcRn está desprovista de un sitio de unión a albúmina funcional. Tal como se ha expuesto anteriormente, el FcRn tiene dos sitios de unión independientes para las inmunoglobulinas y la albúmina. La albúmina es una molécula de 67 kD que constituye dos terceras partes de la masa proteica del suero. Transporta una gran variedad de moléculas tales como ácidos grasos, ácidos biliares, eicosanoides, vitaminas, hormonas, iones, toxinas y fármacos. Asimismo, la albúmina dota la sangre de la mayoría de su presión osmótica coloidal y es la mayor proteína tampón de pH del suero. En un estado normal, el nivel total de IgG se encuentra en el rango de 10-15 mg/ml (Manz y col., 2005) y el nivel de albúmina es de 40-48 mg/ml (Beers y Berkow, 1999). Aproximadamente el 75 por ciento de la presión osmótica coloidal total del plasma resulta de la fracción de albúmina y el 25 por ciento de las globulinas (principalmente la IgG) (Guyton, 1991). Debido a que el peso molecular de la IgG es casi tres veces el de la albúmina (150-160 contra 67 kDa), en base a un simple cálculo de su relación molecular (que incluye la presión osmótica coloidal), el incremento de tres unidades de IgG es idéntico al incremento de una unidad de albúmina en cuanto a la presión oncótica del plasma (que es la presión atribuida a la fracción de proteína del suero). Por tanto, la sobreexpresión del FcRn con el propósito de generar más IgG específica del antígeno puede resultar ventajosa, sin embargo puede conducir a un estado más bien nocivo, especialmente si coincide con un nivel más alto de lo normal de albúmina. Como el FcRn se une a la IgG y a la albúmina en dos sitios diferentes (Andersen y col., 2006; Chaudhury y col., 2006) y un estudio reciente demostró que la deleición mutacional del sitio de unión a la albúmina en la cadena- α de FcRn no conduca a la pérdida de unión de IgG *in vitro* (Andersen y col., 2006), se puede concluir que no existe competición alguna entre los dos ligandos.

Incluso a falta de dicho efecto competitivo, dependiendo del número de copias del FcRn presente en el animal Tg, el nivel de albúmina en el suero sanguíneo puede aumentar hasta un nivel tan alto que pueda causar problemas al animal. Por consiguiente, el animal que contiene el FcRn mutante con el sitio de unión a la albúmina no funcional será capaz de funcionar mejor de acuerdo con la invención para producir anticuerpos útiles. El tipo de mutación específica que causa el funcionamiento defectuoso del sitio de unión a la albúmina será determinado fácilmente por el especialista en la técnica, que podrá también llevar a cabo la etapa biológica molecular necesaria y otras etapas para crear el animal Tg sin carga experimental indebida.

Tal como se ha mencionado ya aquí, la salud general del animal es muy importante para poner en práctica la invención de una forma económicamente viable. Se demostró que los animales Tg, tal como se presentan aquí, vivían durante más de un año sin síntomas patológicos.

En otra realización de la presente invención, el método de acuerdo con la invención utiliza un animal Tg que contiene una proteína con actividad de FcRn que comprende una cadena- α quimérica que incluye el dominio intracelular endógeno de la proteína de FcRn del animal Tg en combinación con un dominio extracelular de origen extraño. El componente del dominio extracelular se selecciona tal como se ha descrito anteriormente. En esta realización, la cadena- α quimérica podría ayudar a superar estas situaciones cuando la proteína codificada por el transgén no funciona correctamente debido a que sus propiedades de señalización intracelular no son compatibles con las del animal receptor. Esto convertiría el heterodímero FcRn en no funcional; sin embargo, la capacidad de unión a la inmunoglobulina superior del receptor extraño hace que valga la pena utilizar esta quimera. El especialista en la técnica podrá fácilmente aplicar metodologías de construcción genética del estado de la técnica para generar el receptor quimérico de acuerdo con esta realización.

En otro aspecto descrito aquí, el animal Tg se consigue a partir de un animal que ya es transgénico para producir inmunoglobulinas que son humanas o humanizadas. La técnica ha reconocido la importancia de producir inmunoglobulinas humanas o humanizadas en animales Tg, y dichos animales de distintas especies han sido generados recientemente. Una tecnología que ha sido explorada para generar mAbs de baja inmunogenicidad para la terapia humana *in vivo* implica utilizar ratones Tg que expresan repertorios de secuencias genéticas de anticuerpos humanos. En el futuro puede que sea posible extender esta tecnología más allá de los roedores y utilizar animales de granja Tg (por ejemplo bovinos, conejos) para generar directamente y producir sueros policlonales con secuencias humanas (Lonberg, 2005). La US 2006117395 describe la producción de bovinos Tg que comprende una modificación genética que resulta en la inactivación y pérdida de expresión de sus anticuerpos endógenos y en la expresión de los anticuerpos xenógenos, preferentemente anticuerpos humanos. Esto se realiza mediante la inactivación de la expresión de la cadena pesada de la IgM bovina y, opcionalmente, mediante la inactivación de la expresión de la cadena ligera de la Ig bovina, así como mediante la introducción posterior de un cromosoma artificial que resulta en la expresión de anticuerpos no bovinos, preferentemente anticuerpos humanos. La US 20070033661 describe otra aproximación para aumentar la expresión de la inmunoglobulina en animales transgénicos no humanos mediante la sobreexpresión del inhibidor de apoptosis, cuya expresión es dirigida por un promotor específico de las células-B específicamente en la célula-B del animal, potenciando así la supervivencia de las células-B. La WO0212437 describe anticuerpos humanizados producidos a partir de animales Tg no humanos que son construidos genéticamente para contener uno o varios loci de inmunoglobulina humanizada capaces de experimentar una reordenación genética y una conversión genética en animales Tg no humanos para producir inmunoglobulinas humanizadas diversificadas. Recientemente se han conseguido conejos Tg que expresan el repertorio de anticuerpos humanizados (Thorey y col., 2006).

Se describen aquí las ventajas significativas de estos animales Tg para la producción mejorada de inmunoglobulinas. Por ejemplo, la selección e introducción del transgén de FcRn de acuerdo con los procedimientos señalados en la presente descripción podrían asegurar una producción de inmunoglobulinas en estos animales Tg óptima mediante la utilización del socio de unión más eficaz a FcRn para las inmunoglobulinas producidas por el animal receptor, ya sean inmunoglobulinas endógenas o anticuerpos humanizados o humanos producidos transgénicamente. Por tanto, se contempla utilizar animales ya Tg que producen inmunoglobulinas humanas o humanizadas como punto de partida para introducir una o varias copias de la cadena- α de FcRn y proporcionar las ventajas de los métodos de la presente invención. Alternativamente, un doble animal transgénico con el fenotipo ventajoso podría crearse mediante el apareamiento de un animal Tg que produce inmunoglobulinas humanizadas con un animal generado tal como se describe aquí.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método según se reivindica para la producción de niveles elevados de inmunoglobulinas en el suero de un animal, el cual comprende proporcionar un animal Tg tal como se describe anteriormente y utilizar dicho animal de acuerdo con cualquier protocolo establecido de inmunización para la producción de inmunoglobulinas.

En otro aspecto de la presente invención, la potenciación de la respuesta inmune incluye potenciar la expansión clonal de células B específicas del antígeno. El papel del FcRn en la modulación de la respuesta inmune a través de la expansión clonal de células B y la síntesis de las inmunoglobulinas se reportan aquí por primera vez. Es un descubrimiento notable e inesperado. La mayoría de los estudios que han descrito el estado inmune humoral en animales que carecían de FcRn funcional, ya sea en estudios anteriores en ratones noqueados o más recientemente en animales noqueados de cadena- α de FcRn, no mostraron deterioro de la síntesis de IgG y los bajos niveles de IgG en suero fueron definidos por la protección deteriorada de la IgG en estos animales (Junghans y Anderson, 1996; Roopenian y col., 2003). Otros estudios, sin embargo, reportaron que la síntesis de la IgG se redujo en animales que carecían de $\beta 2m$, sin embargo no llegaron a una explicación definitiva (Ghetie y col., 1996; Israel y col., 1995).

Ocurrió aquí que 25 días después de la inmunización con OVA, había dos veces más células que secretaban la IgM específica de la OVA y tres veces más células que secretaban la IgG específica de la OVA en ratones Tg en comparación con animales wt. La expansión clonal mejorada de células B específicas del antígeno se puede explicar parcialmente por el descubrimiento de que los bazo de los ratones Tg eran significativamente más gordos en comparación con sus controles wt, tal como también se observó. Una reacción inmune más aumentada es soportada además por los perfiles inmunológicos celulares, en los que se encontraron cambios similares en la proporción de componentes celulares después de la inmunización en ratones Tg y wt, pero los ratones Tg mostraron un cambio más radical. En ambos grupos había una disminución proporcional de células que expresaban B220, CD3, en paralelo con un incremento significativo, aunque moderado, de CD11b⁺ / CD11c⁺ / MHC11, y un influjo significativamente masivo de células portadoras CD11b^{alto} / Gr-1^{alto}, lo que sugiere que la población celular dominante que afluyó al bazo durante la respuesta inmune secundaria se componía de neutrófilos y, en menor medida, de macrófagos y/o células dendríticas. En consecuencia, en otro aspecto de los métodos de la presente invención, la potenciación de la respuesta inmune incluye el estímulo del flujo de neutrófilos, macrófagos y/o células dendríticas a los órganos linfoides secundarios.

Los órganos linfoides periféricos o secundarios son los lugares donde se inician las respuestas inmunes adaptativas y donde se mantienen los linfocitos. Éstos son los nódulos linfáticos, el bazo y los órganos linfoides mucosales. Consecuentemente, en realizaciones preferentes, el órgano linfoide secundario es el bazo y los nódulos linfáticos.

Aunque se observó la expresión de FcRn en monocitos, macrófagos y células dendríticas (Sachs y col., 2006; Stirling y col., 2005; Zhu y col., 2001), su función en estas células sigue siendo poco clara y, ello, el papel del FcRn en la presentación del antígeno, que tendría una consecuencia directa sobre la síntesis de las inmunoglobulinas, sigue siendo poco claro. Por otra parte, un estudio más reciente reveló que el FcRn desempeña un papel más importante en la fagocitosis mediada por IgG en monocitos y leucocitos polimorfonucleares (Vidarsson y col., 2006). Debido a que se detectó la expresión de bFcRn en neutrófilos y macrófagos derivados del peritoneo de los ratones Tg, se puede suponer que la sobreexpresión de FcRn en estas células media en la fagocitosis potenciada del antígeno (en forma inmunocompleja) e incluso en la presentación del antígeno, lo que resulta entonces en más células plasmáticas productoras de IgG e IgM específicas del antígeno en los órganos linfoides secundarios. Si esta teoría es correcta, esta potenciación es obvia una vez producida la IgG y no antes. En realidad, se encontraron títulos incrementados de IgM solamente después de la aparición de la IgG específica de la OVA, principalmente en la respuesta inmune secundaria. Sin embargo, el análisis del perfil inmunológico celular del bazo demostró que el tipo celular dominante que entró en el bazo después de la inmunización consistía en neutrófilos. En base a otro informe reciente (Maletto y col., 2006), los neutrófilos comprendían la principal población de células portadoras de antígeno en los órganos linfoides una vez que tenía lugar una respuesta inmune específica y se formaba el inmunocomplejo IgG-antígeno. Se demostró también que los neutrófilos en los órganos linfoides secundarios expresaban principalmente el TNF-alfa y contribuían a la calidad de la respuesta inmune secundaria establecida. Este descubrimiento proporciona una explicación plausible sobre por qué existe un influjo notable de las células portadoras de CD11b^{alto} y Gr-1^{alto} en los ratones Tg y wt de los inventores. Dado que los ratones Tg producían mucha más IgG específica de la OVA y sobreexpresaban FcRn en estas células, se puede explicar también por qué los ratones Tg muestran un mayor influjo de estas células en el bazo, mayor expansión clonal

de células B específicas del antígeno y consecuentemente una respuesta más fuerte al anticuerpo en comparación con sus controles de tipo salvaje.

Un aspecto importante de la presente invención es que se desarrolla el mismo nivel de respuesta inmune humoral con menos número de retos antigénicos en comparación con un animal de control no transgénico de la misma especie. Esta característica de la presente invención es muy ventajosa cuando se necesitan al mismo tiempo grandes cantidades de antisueros y que un gran número de animales sean inmunizados en paralelo con antígenos a veces caros. El ahorro en el coste puede ser sustancial incluso cuando se puede eliminar una inyección de refuerzo.

Otro aspecto importante de la presente invención consiste en que se desarrolla más rápidamente el mismo nivel de respuesta inmune humoral en comparación con un animal de control no transgénico de la misma especie. El especialista en la técnica podrá fácilmente adaptar cualquier protocolo de inmunización adecuado cuando se utiliza el animal en un método de acuerdo con la invención y determinar el mejor momento para cosechar los anticuerpos producidos. Cuando el animal utilizado para la producción de anticuerpos se emplea repetidas veces (tal como cabra, oveja, otros animales grandes), esta característica de la invención conducirá a tiempos de ciclo mejorados para cosechar los anticuerpos, siendo evidentes las implicaciones comerciales. Cuando se sacrifica el animal al final del protocolo (tal como conejos), la ventaja comercial es aún mayor: un productor de anticuerpos especializado en el suministro de antisueros por encargo para antígenos suministrados por el cliente será capaz de proporcionar el antisero solicitado más rápidamente, permitiendo así que el cliente se encuentre en una posición ventajosa en el mundo actual, donde los desarrollos científicos se aceleran y la competencia abunda.

Breve Descripción de las Figuras

Figura 1: Estructura y caracterización del transgén BAC bovino 128E04. **A:** representación esquemática del fragmento genómico de BAC 128E04 con las posiciones relativas de bFCGRT y los cinco genes codificantes de la proteína putativa: FLT3LG, LOC539196 y los LOC522073, LOC511234, LOC511235. **B:** El aspecto intacto del transgén integrado fue detectado por PCR. **I:** ADN genómico procedente de la línea transgénica #9; **II:** ADN genómico procedente de la línea transgénica #14; **III:** ADN genómico procedente de la línea transgénica #19 y **IV:** plantillas de ADN genómico del BAC de control 128E04. Ranuras: MM: escala de 1kb, PCRs específicas de 1: BAC 128E04 extremo 5', 2: FLT3LG, 3: LOC539196, 4: FCGRT, 5: LOC522073, 6: LOC511234, 7: LOC511235, 8: BAC12804 extremo 3'. Observar que LOC511234, LOC511235 y los fragmentos específicos del extremo 3' no habían sido amplificados a partir del ADN genómico de la línea transgénica #9.

Figura 2: La metafase se extiende desde los fibroblastos derivados de las líneas transgénicas #14 y #19. El análisis FISH reveló que el clon BAC 128E04 marcado con fluorescencia, que lleva el bFCGRT, se hibridó a segmentos cromosómicos totalmente diferentes en los fibroblastos de ratón #14 y #19 respectivamente, lo que excluye la posibilidad de que el fenotipo de las cepas de ratón transgénico #14 y #19 sea dependiente del sitio de integración.

Figura 3: Curvas estándar de Ct en función del número de copias log (Q) en el caso de la β -actina de ratón y la cadena- α de bFcRn (bFCGRT), respectivamente, con el fin de determinar la cantidad absoluta del número de copias de bFcRn en ratones Mg (línea #14 y #19) utilizando PCR cuantitativa en tiempo real. Ct es el ciclo al que la fluorescencia cruza un valor umbral utilizando la PCR cuantitativa en tiempo real. La detección se realizó mediante tecnología fluorogénica de nucleasa 5k (TaqMan, (Lee y col., 1993) en un Sistema de Detección de Secuencias ABI Prism 7000 (Applied Biosystems Foster City CA, USA)).

Figura 4: Expresión de ARNm específico de bFcRn dependiente del número de copias del transgén. **A:** RT-PCR de las muestras de tejidos hemiciotos de las líneas transgénicas #9 (1,4,7,10), #14 (2,5,8,11), #19 (3,6,9,12) respectivamente. Ranuras: MW: escala de 1kb, 1-3 pulmón; 4-6 hígado; 7-9 intestino de recién nacido; 10-12 glándula mamaria. **B:** análisis Northern para detectar la expresión del ARNm de la cadena- α de bFcRn en las muestras de ARN total de hígado. Ranura 1: ratón de tipo salvaje; 2: bovino, 3-4: los ratones hemi- y homocigotos de la línea #14 corresponden a dos y cuatro copias del transgén de bFcRn; 5-6: los ratones hemi- y homocigotos de la línea #19 corresponden a cinco y diez copias del transgén de bFcRn. **C:** evaluación cuantitativa de la expresión de bFcRn dependiente del número de copias del transgén según se detecta en análisis Northern. Las columnas representan la densidad óptica (media), mientras que las barras de error representan el error estándar de la media. La significancia estadística se indica como sigue: *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$.

Figura 5: nivel proteico dependiente del número de copias de bFcRn en pulmón de ratones Tg y wt. Western blot de la proteína celular total (30 μ g/banda) utilizando un antisero de conejo purificado por afinidad (B4 - extracto de la línea celular MAC-T transfectada de forma estable de la cadena- α de bFcRn (Kacskovics y col., 2006a); WT - ratón de tipo salvaje; TG2 - ratón hemicioto, línea #14; TG5 - ratón hemicioto, línea #19). Los marcadores del peso molecular en kilodalton vienen indicados a la izquierda. El suero purificado por afinidad específico de la cadena- α de bFcRn (Mayer y col., 2002) detectó una banda de aproximadamente 40 kDa en muestras de tejido de pulmón transgénico similares a las del extracto celular de control positivo transfectado (B4) de bFcRn. La segunda banda (flecha discontinua) representa positivamente una forma no glicosilada menos abundante del receptor. La comparación de la cantidad de cadena- α de FcRn recombinante en TG2 y TG5, que corresponde a dos y cinco copias del transgén, respectivamente, revela que la expresión dependiente del número de copias es obvia no sólo a nivel del ARNm sino también a nivel proteico.

Figura 6: Farmacocinética de la IgG de ratón (A) y humana (B) en ratones Tg (línea #14, homocigota, lleva 4 copias de bFcRn) y wt con bFcRn. Los datos modelados (simulados en base al promedio geométrico de los parámetros farmacocinéticos primarios) así como la concentración media de anticuerpos observada ($\mu\text{g/ml}$) para los tres a cinco animales (jóvenes miembros adultos de una camada) se trazaron en función del tiempo (horas después de la inyección) de las IgG de ratón (10 mg/BW_{kg}) y humana (10 y 20 mg/BW_{kg}). Los insertos muestran los valores de la vida media de las IgG inyectadas que se calcularon con el software profesional WinNonLin aplicando los dos modelos compartimentales. Las vidas medias de IgG en los animales Tg fueron significativamente más largas en comparación con los ratones wt. Se ensayaron muestras por duplicado y las barras de error representan el error estándar del promedio (SEM). La significancia estadística se indica como sigue: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Figura 7: la sobreexpresión de bFcRn resulta en un fuerte aumento de la respuesta inmune en ratones Tg sin alterar su naturaleza. Se inmunizaron vía ip ratones Tg y wt mediante OVA en CFA y 14 días más tarde fueron desafiados con OVA en 1FA. Sueros muestreados en serie se analizaron en busca de IgG e IgM específica de la OVA. En el caso de los ratones Tg, los títulos de IgM fueron más altos en la respuesta inmune secundaria en comparación con los niveles de IgM en la respuesta inmune primaria y significativamente más altos en comparación con los de los ratones wt. Los niveles de significancia indican la diferencia entre los ratones Tg y wt (A). Los títulos de IgG específicos de la OVA se triplicaron casi en los ratones Tg en comparación con los de los animales wt durante la respuesta inmune secundaria. Los niveles de significancia indican la diferencia entre los ratones Tg y wt (B). A los 32 días de la inmunización, se analizaron los títulos de los isotipos de IgG específicos de la OVA. Los ratones Tg produjeron títulos significativamente más altos de los isotipos de IgG (excepto IgG3), sin embargo la proporción de los mismos no fue diferente comparado con la de los ratones wt, indicando que la sobreexpresión de bFcRn incrementó la producción de IgG específica de la OVA sin alterarla (C). La producción total de IgG reflejó los títulos de IgG específica de la OVA, los ratones Tg produjeron una cantidad significativamente más alta de IgG en comparación con sus hermanos wt. Es de notar que mostraron niveles más altos de IgG incluso antes de la inmunización (D). Los valores mostrados son el promedio $\pm$ SEM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns, $p > 0,05$. La eficacia de la captación del inmunocomplejo FITC-OVA se analizó mediante FACS (E). La línea de puntos negros indica la autofluorescencia de las células P388, la línea gris indica la captación de OVA-FITC no inmunocomplejado; la línea negra indica la captación del inmunocomplejo OVA-FITC preparado a partir de sueros wt, mientras que la zona en gris representa la captación del inmunocomplejo OVA-FITC preparado a partir de sueros Tg. Encontramos fagocitosis no potenciada mediante la utilización de 2,5 μl de sueros en comparación con la captación de OVA-FITC (2,5 μl). Sin embargo, se observó un potenciación significativa mediante la utilización de 10 μl de sueros procedentes de ratones Tg, mientras no había ningún aumento de la fagocitosis en esta cantidad procedente de ratones wt (10 μl). Finalmente, 40N.1 de sueros procedentes de ratones Tg y wt resultaron en una fagocitosis igualmente incrementada en comparación con la forma no inmunocomplejada de OVA-FITC (40 μl).

Figura 8: Los ratones Tg y wt respondieron similarmente a la inmunización con FITC-dextrano. Los ratones Tg (línea #14) y wt fueron inmunizados vía intraperitoneal con FITC-dextrano y fueron desafiados similarmente dos semanas más tarde. Observamos en primer lugar la IgM específica de FITC, sin diferencia entre los animales Tg y wt. Al analizar la respuesta inmune durante el transcurso de la inmunización, observamos una producción incrementada de IgM después de la segunda inmunización en los ratones tanto Tg como wt.

Figura 9: células de bazo procedentes de ratones (tres animales machos en cada grupo) inmunizadas con OVA+CFA, desafiadas el día 14 con OVA+IFA, y cosechadas el día 25. Se duplicaron las células productoras de IgM específicas de la OVA, mientras células de IgG específicas de la OVA fueron más que triplicadas en el bazo de los ratones Tg en comparación con las de los animales wt (A). 25 días después de la inmunización con OVA se observó un incremento del peso del bazo (B) y el número de células (C) en los ratones tanto wt como Tg, sin embargo el tamaño del bazo y los números de células fueron significativamente más importantes en los ratones Tg comparados con los ratones wt. Los valores mostrados son el promedio $\pm$ SD (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,01$; p<0,001).

Figura 10: Análisis de la distribución celular del bazo en ratones wt y Tg normales e inmunizados con OVA (25 días después de la inmunización). Descubrimos que, después de la inmunización, las relaciones de las células portadoras de los antígenos CD45R/B220 (linfocitos B) e I-A/I-E (MHC de clase II) se redujeron significativamente ($p < 0,05$). No existía diferencia o disminución menos radical con respecto a las células portadoras del marcador CD3 (linfocito T) en los ratones wt y Tg, respectivamente. Los histogramas muestran el porcentaje de células (promedio $\pm$ SD) portadoras de CD45R/B220 (linfocitos B), CD3 (linfocitos T) y antígenos I-A/I-E (MHC de clase II) (área rayada) o controles específicos del isotipo (línea negra). Se muestra un experimento típico realizado ($n = 3$ ratones por grupo).

Figura 11: La inmunización resultó en un flujo masivo de neutrófilos en el bazo. Para caracterizar además las células que migran al bazo 25 días después de la inmunización, se analizaron mediante citometría de flujo mediante la técnica de doble marcaje. Se descubrió que las células portadoras de los antígenos CD11b^{alto} y Gr-1^{alto} se elevaron aproximadamente cinco veces en ratones wt y nueve veces en ratones Tg después de la inmunización (A). Se descubrió asimismo que la relación de las células portadoras de los antígenos CD11b y MHC de clase II (macrófagos, células dendríticas) (B) y los antígenos CD11b y CD11c (células dendríticas) (células seleccionadas C) se encontraba significativamente elevada en los ratones Tg en comparación con sus controles wt. Los gráficos de trazados de la densidad muestran un experimento típico realizado ($n = 3$ ratones por grupo). Los valores del gráfico de barras mostrados son el promedio $\pm$ SD; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Figura 12: Expresión RT-PCR específica de bFcRn en neutrófilos y macrófagos derivados de células peritoneales. Los amplicones específicos de bFcRn se amplificaron con éxito a partir de muestras de ratones Tg. Marcas: M1 - escala de ADN 100pb de Bench Top (Promega); 1 - ratones wt con células peritoneales no purificadas; 2 - células peritoneales no purificadas de ratones Tg; 3 - neutrófilos purificados (CD11b^{alto}, Gr-1^{alto}), macrófagos y células dendríticas (CD11b^{alto}, gr-1^{bajo}) de ratones Tg analizados también mediante citometría de flujo, 4 - amplificación a partir de un plásmido que contiene el ADNc de cadena-α de bFcRn. La flecha indica una banda de ADN de 548 pb, específica de bFcRn. El gráfico de trazado de la densidad muestra un experimento típico realizado.

Figura 13: Presencia de células portadoras de OVA-FITC en el bazo. Ratones inmunizados con OVA (56 días después de la inmunización) y ratones transgénicos no inmunizados (homocigotos #14) fueron tratados vía intraperitoneal con UVA-FITC. Cinco horas después del tratamiento, se analizaron las células del bazo mediante citometría de flujo y se encontró que 15,1±1,4% de células positivas para OVA-FITC estaban presentes en el bazo de los ratones inmunizados con OVA, mientras que no se encontró un número considerable de células positivas para OVA-FITC en los animales no inmunizados (2,1±0,3%). Las imágenes confocales muestran células procedentes del bazo de ratones inmunizados con OVA y no inmunizados. Los núcleos de las células se tiñeron con una sonda de ADN permeable a células fluorescente en el rojo DRAQ5 mientras que FITC-OVA se puede ver en forma de puntos brillantes (A). Entre las células positivas para FITC, 61,2±5,4% fueron positivas para B220 (linfocitos B), 18,5±0,6% fueron positivas para CD11b^{alto} y Gr-1^{alto} (neutrófilos) y 13,5±2,1% fueron células positivas (dendríticas) para CD11b y CD11c en los animales inmunizados con OVA (B). OVA-FITC está internalizado en un neutrófilo típico que tiene un núcleo polilobulado, mientras que OVA-FITC se detecta en la superficie de una célula que tiene un núcleo grande, de forma redonda y un borde delgado de citoplasma, probablemente el linfocito B (C). Los gráficos de trazado de la densidad y los histogramas muestran un experimento típico (n = 3 ratones por grupo); los datos indican el porcentaje de células (promedio±SD). Las escalas gráficas indican 10 μm.

Figura 14: Análisis RT-PCR de un ratón transgénico fundador de VIH-P2-FcRn. (A) RT-PCR con cebadores previstos para el promotor P2, tamaño de fragmento esperado: 579 pb, (B) RT-PCR con cebador previsto para el exón 4 de FcRn bovino, tamaño de fragmento esperado: 161 pb. Muestras: 1. pulmón de ratones con VIH-P2-FcRn; 2. hígado de ratones con VIH-P2-FcRn; 3. intestino de ratones con VIH-P2-FcRn; 4. bazo de ratones con VIH-P2-FcRn; 5. ADN genómico de ratones con VIH-P2-FcRn; 6. ADN genómico bovino; 7. ADN genómico de ratones de control; 8. ADNc de hígado bovino; 9. ADNc de ratones de control; 10. Control negativo.

Figura 15: La sobreexpresión de bFcRn influye seriamente en el metabolismo de la albúmina. Niveles de albúmina en suero en ratones wt, homocigotos #14 y #19 (expresan 4 y 10 copias de bFcRn, respectivamente) carentes de FcRn (FcRn KO). Se observaron diferencias significativas cuando se compararon los niveles de albúmina de ratones KO y WT (p<0,01); ratones WT y TG4 o TG10 (p<0,001).

Figura 16: Depuración de IgG de conejo en ratones transgénicos (KO_bFcRn) de FcRn bovino FcRn^{-/-} y en FcRn^{-/-} (KO). A. PCR multiplex para identificar ratones F2 con el genotipo bFcRn / mFcRn^{-/-} (indicado con un rectángulo). Se crearon ratones F2 a través del cruzamiento de ratones F2 nacidos del cruzado de las cepas parentales bFcRn/mFcRn X mFcRn^{-/-} neo⁺. Se describen los cebadores en el Ejemplo 12. Tamaños esperados de los fragmentos: bFcRn: 610 pb; neo: 345 pb; mFcRn 278 pb. Ranuras: 1. bFcRn⁺, neo⁺, mFcRn⁺; 2. bFcRn⁺, neo⁺, mFcRn⁺; 3. bFcRn⁺, neo⁺, mFcRn⁺; 4. bFcRn⁺, neo⁺, mFcRn⁺; 5. bFcRn⁺, neo⁺, mFcRn⁺; 6. bFcRn⁺, neo⁺, mFcRn⁺; 7. bFcRn⁺, neo⁺, mFcRn⁺; 8. bFcRn⁺, neo⁺, mFcRn⁺; 9. bFcRn⁺, neo⁺, mFcRn⁺; 10. bFcRn⁺, neo⁺, mFcRn⁺; 11. bFcRn⁺, neo⁺, mFcRn⁺; 12. bFcRn⁺, neo⁺, mFcRn⁺; 13. ADN genómico bovino; 14. bFcRn⁺, neo⁺, mFcRn⁺; 15. control negativo. B. Farmacocinética de IgG de conejo en ratones FcRn^{-/-} (KO) y en ratones transgénicos FcRn bovino FcRn^{-/-} (KO_bFcRn). Se depuró rápidamente la IgG de conejo en ratones FcRn^{-/-} (vida media: 15 horas), pero se protegió en bFcRn/FcRn^{-/-} (vida media: 67 horas). Se inyectaron i.v. a los animales 150 μg de IgG de conejo. Se trataron tres grupos de ratones y los datos son representativos de dos experimentos independientes. Los datos muestran los valores medios y las barras de errores representan el error estándar del promedio (SEM).

Figura 17: Análisis PCR de un conejo transgénico bFcRn. PCR, con cebadores diseñados para detectar el 4º exón de FCGRT bovino. El tamaño esperado es de 160 pb. Muestras: 1. ADN genómico de conejo 38/JT; 2. ADN genómico bovino; 3. ADN genómico de ratón FVB/n; 4. control en blanco; escala de 1kb MM.

Figura 18: Caracterización BAC de conejo 262E02. Los cebadores y condiciones de PCR utilizados para evaluar la presencia de genes de conejo vienen descritos en la Tabla 7 del Ejemplo 15.

Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento y caracterización de los clones BAC que contienen el gen de cadena-α de hFcRa (bFCGRT) (ejemplo preparatorio)

Aislamiento de clones BAC que contienen el hFCGRT

BAC 90α se aisló de una librería de BAC bovi no elaborada a partir de ADN procedente de linfocitos de un macho adulto (2 años) Bos taurus Jersey (obtenido del Centro de Recursos / Base de Datos Primaria del Proyecto Alemán sobre el Genoma Humano (RZDP), Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin, Alemania: <http://www.rzdp.de/>). Un clon BAC positivo de bFCGRT fue identificado por exploración PCR con cebadores específicos

del ARNm de la cadena- α de bFcRn [206 425 hp. GenBank AF139106) fue BFcIS amplificado por PCR: 5'-CAGTACCACTTCACCGCCGTGT-3' (SEQ ID NO.: 1); BFclas: 5'-CTTGAGCGCTTCGAGGAAGAG-3' (SEQ ID NO. 2)]. La etapa siguiente consistió en secuenciar ADN de bFCGRT con cebadores que se alinean con los exones del gen (Kacskovics y col., 2000). Con el fin de analizar la región flanqueante aguas arriba de bFCGRT, el ADN de BAC fue digerido con BamHI, y el ADN digerido se separó en gel de agarosa. El Southern blot detectó una banda positiva de 9 kb de largo mediante un fragmento de ADN procedente del dominio al, como sonda. El fragmento de BamHI de 9 kb de largo fue subclonado después en el vector pGEM-11zf(+). Un proceso adicional de subclonación resultó en 2 kb de los segmentos promotores con el exón 1 hasta el exón 3 en el mismo vector. El inserto se secuenció completamente entonces con el Kit de AB1 Prism BigDye Terminator Cycle sequencing Ready Reaction (AB1. 373A-Stretch, Perkin Elmer) de Cybergene Company (Huddinge, Suecia).

Se aislaron los BACs 189H02 y 128E04 mediante los cebadores específicos de bFCGRT: FcRnF: 5'-CGGCCACCTCTATCACATTT-3' (SEQ ID NO: 3) y FcRnR: 5'-TGCATTGACCACACTTGGTT-3' (SEQ ID NO: 4) (GenBank NW_929385) de una librería de BAC bovino (Eggen y col., 2001). El tamaño del inserto de los clones de BAC aislados se analizó mediante digestión de los clones con la endonucleasa de restricción NotI. Se utilizó el Expand Long Template PCR System (Roche) para determinar el tamaño de las regiones limítrofes 5' y 3' del hFCGRT en los insertos. Se diseñaron dos conjuntos de cebadores: cebadores pBAC-superior (5'-ACCTCTTTCTCCGCACCCGACATAG, SEQ ID NO.: 5. U80929.11380-11404) y bFcRN-antisentido (GTTCAAGTCCAAAGGCAGGCTATCT, SEQ ID NO.: 6) amplificaron la región saliente 5'.

Por otra parte, un bFcRn-sentido (CCTTTACCCACACCCACTCCCCACA, SEQ. ID NO.: 7) y un pBAC-inferior (AGAAGTTCGTGCCGCCGCGTAGTA, SEQ ID NO.: 8, U80929.3801-3777) como cebadores antisentido se utilizaron para amplificar la región saliente 3' del bFCGRT.

Caracterización del bFCGRT

Aproximadamente 1800 pb de la región aguas arriba del inicio de la transcripción así como la totalidad del gen del bFCGRT fueron secuenciados y comparados con las secuencias genómicas bovinas depositadas en NCBI con el programa BLAST. El fragmento secuenciado se exploró en busca de repeticiones intercaladas y secuencias de ADN de baja complejidad utilizando el programa RepeatMasker (Smit y col., 1996-2004) (<http://repeatmasker.org>). Las bases de datos con repeticiones intercaladas exploradas mediante el RepeatMasker se basan en bases de datos con repetición (Repbase Uptake; Jurka y col., 2005). Los datos están de acuerdo con la secuencia de vaca depositada en NCBI y los primeros 3477 pb (hasta la región de 2,5 kb no secuenciada) muestran un 99% de identidad con el clon NW_92938S (contig genómico del cromosoma 18 de *Bos taurus*), aunque había un espacio grande de 285 pb entre los 2002 y 2287 pb que pertenece al primer intrón. La segunda parte de la secuencia analizada contenía 1 78<t pb (después del segmento de 2,5 kh no secuenciado) que muestra un 99% de identidad con el mismo contig genómico. Este fragmento tiene también un espacio amplio de 167 pb (entre los 1203 y 1370 pb) que pertenece al intrón 6. Los dos segmentos no identificados contienen secuencias repetitivas (repetición simple), lo que explica la falta de homología. En base a estos alineamientos, se calculó que el tamaño del espacio que faltaba era de 2556 pb. Por tanto, se descubrió que la secuencia muestra un gran homología con el contig genómico de bovino NW_929385, entre 648611 y 656426 pb.

El sitio de iniciación de la transcripción mediante alineamiento de las secuencias disponibles de ADNc de cadena- α de bFcRn ha sido analizado también (secuencias de referencia así como secuencias procedentes de la base de datos EST; NCBI) con respecto a la secuencia genómica de bFCGRT. Las organizaciones genómicas de los genes FCGRT bovinos, humanos, de ratas y de ratones se compararon por medio del NCBI Map Viewer (datos no indicados).

Caracterización de los clones BAC positivos de bFCGRT

Se aislaron tres clones BAC diferentes -90 α , 189H02 y 128E04- que contenían el gen de cadena- α del receptor Fc neonatal bovino (bFCGRT) y su propio entorno genómico. Después de la digestión con NotI, los insertos genómicos procedentes de los vectores BAC se analizaron mediante electroforesis en gel de campo pulsado, lo que reveló que el clon 189H02, el clon 128E04 y el clon 90 α contienen aproximadamente insertos genómicos bovinos con un tamaño de 130 kb, 100 kb y 90 kb, respectivamente.

Entonces, el tamaño de las regiones limítrofes del gen bFCGRT se determinó por PCR de largo alcance. Los datos mostraron que los BACs 90c y 189H02 llevaban las regiones flanqueantes 5' y 3' de 8,5 kb y 14 kb respectivamente, que, en base a sus tamaños, puede no poseer todos los elementos reguladores que aseguran el sitio de integración independiente, la expresión específica en tejido del gen bFCGRT. La amplificación por PCR del clon 128H02 con los dos conjuntos de cebadores no reveló ningún producto. Como el Expand Long Template PCR System es un método de fuerte amplificación y genera amplicones de hasta 25 kb procedentes de ADN del fago, se concluyó que las regiones limítrofes tanto 5' como 3' del bFCGRT en este clon tenían una longitud superior a 25 kb, por tanto se seleccionó el BAC 128E04 para la microinyección.

Datos recientes en la página de Bovine Genome Resources (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/cow/>) y las secuencias de los extremos 5' y 3' del BAC 128E04 permitieron determinar el contexto genómico y el tamaño exacto de las regiones limítrofes de bFCGRT: la región reguladora 5' se extiende hasta 44 kb, mientras que la 3' es de 50 kb de longitud. Los datos revelaron que el BAC

128E04 contenía cinco genes codificadores de proteína putativa (FLT3LG, LOC539196, LOC522073, LOC511234, LOC511235) y el bFCGRT (**Fig. 1A**).

Ejemplo 2: Generación y genotipificación de ratones transgénicos portadores de BAC bovino 128E04 (ejemplo preparatorio)

5 Preparación del inserto genómico de 102 kb procedente del clon BAC 128E04 para la microinyección y generación de ratones transgénicos portadores del BAC bovino 128 E04

La preparación de ADN de BAC (clon 128E04) para microinyección se realizó mediante ligera modificación o por el protocolo publicado por Schedl y col. (Schedl y col., 1996). El BAC purificado (purificación de plásmidos Qiagen para plásmido con muy bajo número de copias) fue digerido con Not 1 (fermentos) para liberar el inserto, el cual se aisló en un gel de agarosa al 1% de campo pulsado preparativo. La rodaja de gel conteniendo el inserto penetró en un gel LMP (bajo punto de fusión) que fue digerido con Gelasa (Epicentre). Se utilizó la columna YM50 de Microcon (Millipore) para limpiar el inserto de agarosa. Se eluyó el inserto en un tampón adecuado para la microinyección (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 mM EDTA, pH 8,0, 100 mM NaCl suministrado con o sin 0,03 mM de espermina/0,07 mM de espermidina - (SIGMA)). La concentración de ADN se ajustó a 0,4 ng/μl utilizando un tampón de microinyección (10 mM Tris -HCl, pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 100 mM NaCl) y se inyectó en ovocitos de ratón FVB/N fertilizados. Los receptores fueron hembras CD1 de 10 semanas de edad. Los animales experimentales se obtuvieron de Charles Rivers Laboratories Hungary Ltd. (Budapest).

Caracterización de los ratones transgénicos

Para detectar la presencia del bFCGRT en los ratones, se aisló ADN genómico de biopsias de la cola de las camadas nacidas mediante transferencia de embrión y los fundadores de la progenie G1 y G2 y se exploraron mediante dos amplificaciones por PCR. Los dos pares de cebadores se diseñaron en base a la secuencia de bFCGRT del clon de BAC 90a. El primer par de cebadores se componía del bFcSuf: 5'-CTCCTTTGTCTTGGGCACTT-3' (SEQ ID NO: 9) como sentido y BFcL: 5'-GCCGCGGATCCCTTCCCTCTG-3' (SEQ ID NO: 10) como antisentido; lo que dio lugar al producto de 600 pb (1275 - 1894 pb), mientras que el segundo par de cebadores fue Fcrnpr/in: 5'-AAAGTTTCTCGAGAGAGGCAGAGAC-3' (SEQ ID NO: 11) como sentido y Fcmrpr/in: 5'-TAGTTACAGAGCCTGGATAGGCTGA-3' (SEQ ID NO: 12) como antisentido, lo que dio lugar a un producto de 410 pb (1698 - 2108 pb). Los resultados de los experimentos de transgénesis se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1 Generación de ratones transgénicos portadores del BAC bovino 128E04

	Constructo inyectado	128E04
Número de embriones	Microinyectados	550
	Transferidos	360
Número de animales	Nacidos	41
	Transgénicos	6
Eficacia de la microinyección	Nº de animal nacido/Nº de Tg	14,6

Tal como se muestra en la Tabla 1, nació un total de 41 animales y se genotipificaron a partir de ADN de la cola en busca de la presencia del bFCGRT. De los seis fundadores, se establecieron tres líneas Tg independientes. Dos de estas líneas #14, #19 mostraron el modelo mendeliano de la herencia del transgén en la primera generación (17 y 12 de un total de 30 y 34 camadas llevaban el transgén), sin embargo la tercera línea #9 indicó un grado de mosaicismo en el animal fundador. Los ratones Tg no se podían distinguir de cada miembro de sus camadas en base a su peso y salud general.

Análisis de la integridad del transgén de largo alcance

La integridad del transgén en las tres líneas Tg se evaluó por medio de los pares de cebadores específicos diseñados para los extremos 5' y 3' del BAC 128E04 y para los cinco genes putativos codificantes de la proteína que están localizados en el 13AC inyectado en base al cromosoma bovino 18 del mapa genómico bovino (GenMark MapViewer Build 3.1 (basado en Btau 3.1); región entre 53543852 - 53652024 pb). Las secuencias y condiciones de los cebadores se describen en la **Tabla 2**.

Tabla 2 Condiciones de PCR y de los cebadores para evaluar la integridad del BAC 128E04 integrado

Gen putativo	Cebador	Tm (°C)	Producto (pb)
BAC128EOH extremo-5'	5'-TTT AGC TGC ATC GGG ATC TT-3' (SEQ.ID.NO.: 13) 5'-GGA GTG ATG GCA TTT GGT TT-3' (SEQ.ID.NO.: 14)	61	441
FLT3LG	5'-TCG GAG ATG GAG AAA CTG CT-3' (SEQ.ID.NO.: 15) 5'-CTG GAC GAA GCG AAG ACA G-3' (SEQ.ID.NO.: 16)	61	547
LOC539196	5'-AGA ACG TGC GTA CCA AAA GC-3' (SEQ.ID.NO.: 17) 5'-AGC GGT TGT ACT TTC GGA TG-3' (SEQ.ID.NO.: 18)	61	787
bFCGRT	5'-CCA AGT TTG CCC TGA ACG-3' (SEQ.ID.NO.: 19) 5'-GTG TGG GCA GGA GTA GAG GA-3' (SEQ.ID.NO.: 20)	61	161
LOC522073	5'-AGT GGT CCT GGG ATT GAC AG-3' (SEQ.ID.NO.: 21) 5'-TCA CTG AGT CCC GTA TGT GC-3' (SEQ.ID.NO.: 22)	61	266
LOC511234	5'-CTA CGT GTG CGC CGT GAC-3' (SEQ.ID.NO.: 23) 5'-AAT CAG CTT CTC CAC GCA CT-3' (SEQ.ID.NO.: 24)	61	220
LOC511235	5'-GTT GTT CAC ACC AGG GAA CC-3' (SEQ.ID.NO.: 25) 5'-CCT TTG CCA TTG TAG ATG TAG C-3' (SEQ.ID.NO.: 26)	61	295
BAC128EOH extremo-3'	5'-AGT CGT GTC CGA CTC TTT GC-3' (SEQ.ID.NO.: 27) 5'-CAG CCT GTC TGG TGT TCT GA-3' (SEQ.ID.NO.: 28)	61	416

Las secuencias de BAC128EOH extremo-5' y BAC128EOH extremo-3' se obtuvieron de A. Eggen (INRA, Jouy-en-Josas, Francia). Todos los pares de cebadores produjeron los mismos productos de PCR como el BAC 128E04 y el ADN genómico bovino, lo que indica la integración del BAC intacto salvo la línea #9 ADN en la que la PCR específica de LOC 511234, LOC 522235 y BAC 128E04 extremo-3' no resultó en productos de PCR (**Fig. 1B**). Por tanto, se puede concluir que en esta línea Tg faltaba un fragmento con longitud estimada de 30 kb procedente del extremo 3' del transgén BAC integrado. La pérdida de fragmentos genómicos de los extremos tanto 5' como 3' de largos transgenes es un fenómeno común (Raguz y col., 1998). Sin embargo, para evitar la posibilidad de una expresión alterada de bFCGRT debido a la ausencia de elementos reguladores no caracterizados que pueden situarse en la parte faltante del ADN de BAC, no se incluyó la línea #9 en los demás estudios.

10

Localización cromosómica del transgén

Con el fin de excluir la posibilidad de que el clon 128E04 del BAC bovino se hubiera integrado accidentalmente en un segmento idéntico de un cromosoma de ratón en ambas líneas transgénicas y así el fenotipo de las líneas #14 y #19 de ratón transgénico fuera resultado de la mutagénesis insercional de gene(s) no identificados en los sitios de integración del transgén, se realizó una hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) para visualizar la integración genómica del transgén 128E04. Se marcó el ADN de BAC 128E04 mediante traslación de mellas (nick) con biotina-14-dATP (kit de marcaje BioNick, Invitrogen, USA). Los cromosomas mitóticos se obtuvieron de fibroblastos tratados con vinblastina, los cuales se aislaron de los embriones homocigotos #14 y #19 de 13,5 días de edad respectivamente siguiendo los protocolos estándar que implican el tratamiento hipotónico y la fijación en metanol:ácido acético (3:1).

Se realizó una FISH esencialmente tal como se ha descrito anteriormente (Hayes y col., 1992). La sonda biotinilada se desnaturalizó y se dejó hibridar hasta que el cromosoma desnaturalizado se extendiera durante toda la noche a 37°C. Los sitios de hibridación en los cromosomas fueron amplificados con un anticuerpo anti-biotina producido en cabra (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) y se visualizaron mediante otra incubación con IgG anti-cabra de conejo conjugada con fluoresceína (Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Países Bajos). Las preparaciones cromosómicas fueron contrateñidas con diamidino-2-fenilindol (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se observaron con un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E600 (Nikon Instruments; Kawasaki, Japón). Se capturaron las imágenes de fluorescencia con una cámara Cohu 4910 CCD (Cohu, Inc.; San Diego, CA, USA) y se digitalizaron con el software MacProbe 4.3 FISH (Applied Imaging; Newcastle upon Tyne, Reino Unido), que funciona en un ordenador Apple Macintosh G4.

El resultado del análisis FISH reveló que el BAC 128E04 marcado con fluorescencia se hibridó a segmentos cromosómicos totalmente diferentes en las cepas de ratones #14 y #19 respectivamente. Esto excluye la posibilidad de que sus fenotipos sean dependientes del sitio de integración. Los puntos solos en los cromosomas indican que múltiples copias (2 en la línea #14, y 5 en la línea #19) de la integración del transgén tuvieron lugar probablemente en forma de repeticiones en tándem (Fig. 2).

Ejemplo 3: Efecto del número de copias del gen bovino FCGRT (bFCGRT) sobre la expresión de FcRn (ejemplo de fondo)

Determinación del número de copias del transgén con la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

La PCR en tiempo real es un método cuantitativo y preciso para determinar el número de copias y la cigosidad de los transgenes en animales Tg (Tesson y col., 2002). Los números de copias del transgén BAC 128E04 fueron determinados por cuantificación absoluta del bFCGRT y de los genes de β actina en ratón como estándar interno, como sigue.

Los números de copias del transgén BAC 128E04 fueron determinados con el método TaqMan, utilizando el Sistema de Detección de Secuencias ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se diseñaron las secuencias de oligonucleótidos de los cebadores y de las sondas con el programa Primer Express v2.0 (Applied Biosystems) utilizando parámetros por defecto (se indican en la Tabla 3 los cebadores y las sondas). Se utilizó el método convencional de fenol/cloroformo para la extracción de ADN de muestras de cola de los animales hemiciotos, con una etapa adicional de extracción con cloroformo.

Tabla 3 Cebadores y sondas para las determinaciones del número de copias del transgén bFCGRT

β-actina ratón	Sonda	VIC-TGGCTTTCTGAACTTGACAACATTAT-TAMRA (SEQ.ID.NO.: 29)
	directa	TTCACCTGCCCTGAGTGTTC (SEQ.ID.NO.: 30)
	inversa	TGAAGGTCTCAAACATGATCTGTAGA (SEQ.ID.NO.: 31)
FCGRT bovino	Sonda	FAM-CACAGTCAAGAGTGGCGACGAGCAC-TAMRA (SEQ.ID.NO.: 32)
	directa	GCACCACGCAGCGGTAGT (SEQ.ID.NO.: 33)
	inversa	CCTTCTACGCCTGGTCATCAC (SEQ.ID.NO.: 34)

5 Los genes bFCGRT y de β-actina de ratón se cuantificaron en cada muestra mediante cuantificación absoluta utilizando curvas de calibración. Las curvas estándar, utilizando cinco puntos, diluidas en un rango de 32 veces, condujeron a una alta linealidad con los conjuntos de cebadores. La linealidad y eficacia de la cuantificación por PCR se validaron antes de la cuantificación. Las muestras se realizaron por duplicado (Fig. 3).

10 El gen de β-actina endógena que es representado por dos copias en cada célula se utilizó como estándar interno para determinar la concentración de ADN. Se utilizó ADN genómico de ratón para establecer la curva de calibración para el gen de β-actina. La cuantificación absoluta del gen bFCGRT se realizó en base a una curva estándar generada a partir de diluciones seriales del BAC 128E04 complementado con ADN genómico de ratón. Las curvas estándar permitieron determinar los números de copias del gen bFCGRT en base a los siguientes cálculos: la cantidad exacta de ADN determinó el número de genomas diploides en las muestras, mientras que la curva de calibración del gen bFCGRT determinó su número de copias en muestras de ADN de animales hemicigotos de las líneas #14 y #19.

15 Después de llevar a cabo estos cálculos, se determinó que el número de copias del gen bFCGRT era de 2 y de 5 en animales hemicigotos en las líneas #14 y #19 de ratones Tg, respectivamente (Tabla 4).

20 **Tabla 4 Cantidad absoluta del número de células y cantidad absoluta del número de copias de FcRn de las muestras derivadas de las curvas de calibración de bFcRn y β-actina de ratón, respectivamente (Fig. 3). El número de copias estimado del transgén de bFcRn en animales hemicigotos fue de 2 en la línea #14 y de 5 en la línea #19**

#línea	gen	Ct	Cantidad absoluta de gen en muestra (AGN)	Cantidad absoluta de n° células en muestra (ACN)	N° copias de bFcRn (ACNb-FcRn/ACN)	N° copias estimado del transgén bFcRn en animal hemicigoto diploide
14	β-actina de ratón	31,01	3760,49	1880,248		
	bFcRn	28,86	3852,48		2,04	2
19	β-actina de ratón	30,89	4075,44	2037,722		
	bFcRn	27,05	10468,18		5.13	5
<i>Determinación del número de copias al nivel de transcripción por PCR de transcriptasa inversa y análisis Northern</i>						

25 Se extrajo ARN total mediante la utilización de RNAzol™ B (TEL-TEST INC) procedente de hígado, pulmón y glándula mamaria de hembras de seis semanas de edad y del intestino de recién nacidos. Dos microgramas de ARN fueron transcritos de forma inversa utilizando la enzima transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV) y del cebador adaptador 17 (dT) tal como lo recomienda el fabricante (Acces RT-PCR System; Promega). Se realizó la PCR para obtener un amplicón específico de bFCGRT de 367 pb de longitud (914-1280 pb, (Kacskovics y col., 2000)) por los pares de cebadores: B7 5'-GGCGACGAGCACCCTAC-3' (SEQ ID NO: 35) y B8 5'-

GATCCCCGGAGGTCWCACA-3' (SEQ ID NO: 36) (donde W puede ser A o T). El segmento amplificado se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se tiñó con bromuro de etidio.

Como los transcritos de FcRn de rumiante se han detectado en múltiples células epiteliales (Kacskovics y col., 2006b; Mayer y col., 2004; Mayer y col., 2002) y también en células endoteliales vasculares (Kacskovics y col., 2006a), se analizó la expresión de la cadena- α de bFcRn en el pulmón, hígado y glándula mamaria de hembras Tg lactantes adultas y de los intestinos de recién nacidos por RT-PCR. El ARNm de cadena- α de FcRn bovino se expresó en la totalidad de los tejidos seleccionados de animales hemicigotos en las líneas #9, #14 y #19 (Fig. 4A).

Para evaluar la dependencia del número de copias de la expresión del transgén y compararla con la cantidad de ARNm de cadena- α de FcRn bovino endógeno, se analizaron mediante Northern blot muestras de ARN de hígado procedente de bovinos e individuos de las líneas #14 y #19. Se aisló ARN total de los hígados de jóvenes ratones hembras adultas y 5 μ g de ARN total fue fraccionado por tamaños en gel de agarosa al 1% / 2,2 M de formaldehído, se transfirió a membrana Hybond N+ (Amersham) y se hibridó con la sonda de ADNc marcado 32 P sintetizada por PCR con los cebadores B7-B8 descritos anteriormente. Se utilizó la señal de ARN 18S como estándar interno para evaluar la carga de ARN en los geles. Las señales obtenidas se evaluaron con un PhosphorImagerTM y se cuantificaron con STORMTM (Molecular Dynamics). La comparación entre las densidades de las señales específicas de ARNm de bFcRn de las dos, cuatro, cinco y diez copias de ratones Tg se realizó mediante la prueba t de Student.

Los resultados muestran niveles más altos de expresión de ARNm del transgén en la línea #19. El nivel de expresión de ARNm en el hígado de la línea #14 de ratones Tg hemicigotos, que lleva dos copias del transgén de BAC, alcanzó el 90% del que se observó en el hígado bovino (Fig. 4B).

El análisis cuantitativo y la evaluación estadística de la intensidad de la señal de dos o tres animales hemi- y homocigotos de ambas líneas Tg revelaron que la cantidad de ARNm de cadena- α de FcRn bovino en el hígado de ratones Tg está en correlación con los números de copias de su transgén y las diferencias fueron significativas a un nivel de probabilidad $p < 0,05$ (Fig. 4C). Este resultado, junto con el hecho de que el nivel de expresión de ARNm de cadena- α de FcRn en el hígado de ratones Tg portadores de dos copias del transgén era similar al nivel de ARNm en el hígado bovino, indica que el BAC 128E04 lleva todos los elementos reguladores necesarios para asegurar la expresión dependiente del número de copias e independiente de la posición para el bFCGRT.

Detección de la proteína de cadena- α de bFcRn en el pulmón de ratones transgénicos

La expresión de la cadena- α de FcRn bovino a nivel proteico se examinó mediante análisis Western. Los extractos proteicos se resolvieron en gel de poliacrilamida desnaturalizante en Tris-glicina: las manchas se sondearon con anticuerpo de conejo purificado por afinidad (contra el péptido CLEWKEPPSMRLKAR que representa los residuos de los aminoácidos 173-186 altamente conservados de la cadena- α de bFcRn más un Cys N-terminal para la conjugación con KLH (Mayer y col., 2002). El anticuerpo unido de cadena- α de bFcRn se detectó con el anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano y se potenció la quimioluminiscencia, utilizando como sustrato una solución basada en luminol. La línea celular epitelial mamaria bovina (B4) estable transfectada con la cadena- α de bFcRn se utilizó como control positivo (Kacskovics y col., 2006a).

En las muestras de pulmón hemicigotas procedentes de ambas líneas Tg -coherentemente con el peso molecular conocido de la cadena- α de bFcRn (Kacskovics y col., 2000)- se detectó una proteína de 40 kD que no se había encontrado en el ratón de tipo salvaje utilizado como control negativo (Fig. 5). El peso molecular de la cadena- α de FcRn transgénico estaba de acuerdo con la proteína recombinante producida por la línea celular epitelial mamaria bovina B4 que fue transfectada establemente con bFcRn (Kacskovics y col., 2006a). Además, este dato confirmó los resultados del análisis Northern blot, indicando que la muestra procedente de la línea #19 de ratones que expresan 5 copias de bFcRn del transgén muestra mucho más proteína de bFcRn que la que se detectó en la línea #14 de ratones que expresan 2 copias del transgén (Fig. 5).

Estos datos demostraron que el clon de BAC de 102 kb de longitud posee todos los elementos reguladores genéticos necesarios exigidos para la expresión específica de tejidos, reproducible a niveles fisiológicos de la cadena- α de bFcRn (Fig. 4A), lo que subraya que el comportamiento de los transgenes bovinos en ratones debería compararse, siempre que sea posible, con los modelos de expresión para aquel gen en los tejidos bovinos.

Ejemplo 4: Estudios *in vivo* que analizan las vidas medias de la IgG humana y de ratón en ratones transgénicos con BAC bovino (ejemplo de fondo)

Para analizar la expresión de la cadena- α de bFcRn en ratones Tg así como comprobar si la cadena- α de FcRn bovino y la β 2m es capaz de formar un receptor funcional, se analizó la depuración de la IgG humana y de ratón. Esta última se investigó, ya que se había demostrado recientemente que el FcRn bovino se une a la IgG humana mucho mejor que se une a la IgG bovina (Kacskovics y col., 2006a).

Después de un sangrado previo, la línea #14 homocigota con edad, peso y sexo (macho) coincidentes y ratones de control (tres a cinco en cada grupo) fueron microinyectados intravenosamente con 10 mg/kg peso corporal (BW_{kg}) de IgG1 de ratón anti-OVA (mAb. Sigma) o 10 mg/BW_{kg} o 20 mg/BW_{kg} de IgG humana (Gammonativ destinado a uso intravenoso, un amable regalo de Octapharma, Stockholm, Suecia) en 50 mg/ml de solución salina y durante las

siguientes 216 horas, se recogieron muestras periódicas de sangre (50 µl/cada vez) del plexo retro-orbital. Se utilizó un ELISA cuantitativo que empleaba OVA (Sigma) como reactivo de captura y una IgG anti-ratón de cabra policlonal purificada por afinidad conjugada con HRP (específica de la cadena-γ) (Southern Biotech Associates Inc., Birmingham, AL, USA) como reactivo de detección, para evaluar las concentraciones en plasma de IgG1 de ratón anti-OVA durante el experimento. Las concentraciones en suero de IgG humana se determinaron por el ensayo ELISA cuantitativo tal como se ha descrito anteriormente (Kacsokovics y col., 2006a). Se utilizó un ELISA cuantitativo que empleaba ovalbumina (Sigma) como reactivo de captura y una IgG anti-ratón de cabra policlonal purificada por afinidad conjugada con HRP (específica de la cadena-γ) (Southern Biotech Associates Inc., Birmingham, AL, USA) como reactivo de detección, para evaluar las concentraciones en plasma de IgG1 de ratón anti-ovalbumina durante el experimento. El anticuerpo conjugado con peroxidasa se detectó por medio de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina; Sigma) como sustrato. Se ensayaron las muestras por duplicado. Las concentraciones de Ig se reportan en base a un estándar de referencia.

El análisis de las concentraciones medias de IgG de los ratones en los primeros diez días se realizó mediante ajuste de los datos al modelo de dos compartimentos utilizando WinNonLin profesional, versión 4.1 (Pharsight, Mountain View, CA).

Las curvas de depuración para la IgG de ratón eran bifásicas, representando la fase 1 (fase alfa) el equilibrio entre los compartimentos intravascular y extravascular, representando la fase 2 (fase beta) una eliminación lenta. El modelado matemático de las fases 1 y 2 hasta las 216 horas ha mostrado una buena correlación con el esquema general de la farmacocinética de la IgG mediada por FcRn (Lobo y col., 2004), por tanto se calcularon las vidas medias en las fases alfa y beta de la mIgG en este marco de tiempo. Las vidas medias estimadas en la fase alfa se encontraban de forma similar en aproximadamente 5 horas en los ratones Tg y wt, respectivamente. Por contraste, había una diferencia significativa ($p < 0,05$) en las vidas medias en fase beta, tal como de $125,4 \pm 3,2$ horas (media $\pm$ SEM) en los animales wt y de $165,1 \pm 7,8$ horas en los animales Tg, en base a los análisis de modelado de dos compartimentos (Tabla 5; Fig. 6A).

En el caso de la hIgG, de forma similar a los datos de depuración de la mIgG, el modelado matemático de las fases 1 y 2 hasta las 216 horas de los datos derivados de este estudio ha mostrado una buena correlación con el esquema general de la farmacocinética de la IgG mediada por FcRn; por tanto, se calcularon las vidas medias en las fases alfa y beta de la hIgG en este marco de tiempo. En base a los análisis de modelado de dos compartimentos, la fase alfa se encontraba en aproximadamente 10 horas tanto en los ratones de tipo salvaje como en los ratones transgénicos, sin diferencia entre los experimentos de 10 y 20 microgramos por gramo. En el caso de las fases beta, observamos diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los ratones wt y Tg. Las fases beta calculadas estaban en $106 \pm 3,6$ y $171,5 \pm 16,2$ horas cuando se inyectaban 10 microgramos por gramo, mientras que estaban en $108,2 \pm 3,7$ horas y $181 \pm 7,7$ horas cuando se inyectaban 20 microgramos por gramo, en los ratones wt y Tg, respectivamente (Tabla 5; Fig. 6B). Tal como se esperaba, los valores del área bajo la curva (AUC) eran significativamente diferentes, como en el experimento en el que inyectamos 20 microgramos por gramo demostró valores aproximadamente del doble en comparación con el experimento con 10 microgramos por gramo; por otra parte, ni las vidas medias de la fase alfa ni las vidas medias de la fase beta eran significativamente diferentes con la inyección de 10 ó 20 µg de hIgG por gramo.

Cuando comparamos los datos de depuración de la mIgG con la hIgG en estos experimentos (comparando los experimentos con 10 microgramos de IgG por gramo), observamos que la hIgG se depuró de forma significativa más rápidamente ($p < 0,05$) de los ratones wt (106 contra 125,5 horas de IgG humana y de ratón, respectivamente), sin embargo no había diferencia alguna entre los datos de depuración de IgG humana y de ratón en los animales Tg (Tabla 5).

Tabla 5 Parámetros farmacocinéticos de las IgG humanas y de ratón en ratones de tipo salvaje y transgénicos bFcRn. Los valores representan la media $\pm$ SEM; MRT, tiempo de residencia medio; AUC, área bajo la curva

	Dosis (µg/BW _g)	Vida med. fase alfa (horas)	Vida med. fase beta (horas)	MRT (horas)	AUC (hora* µg/ml)	n
WT-mIgG	10	5,2 $\pm$ 0,6	125,4 $\pm$ 3,2	167,7 $\pm$ 5,6	12444,5 $\pm$ 1447	5
TG-mIgG	10	4,6 $\pm$ 0,2	165,1 $\pm$ 7,8	227,2 $\pm$ 11,9	14713,3 $\pm$ 758,8	5
WT-hIgG	10	8,2 $\pm$ 1,8	106 $\pm$ 3,57	139,8 $\pm$ 4,8	7351,2 $\pm$ 376,5	4
TG-hIgG	10	12,7 $\pm$ 1,8	171,5 $\pm$ 16,2	227,9 $\pm$ 21,3	15456 $\pm$ 1214,9	5
WT-hIgG	20	10,8 $\pm$ 5,7	108,2 $\pm$ 3,7	151,8 $\pm$ 5,8	17574,3 $\pm$ 1711	3
TG-hIgG	20	13,2 $\pm$ 7,5	181 $\pm$ 7,7	265,1 $\pm$ 5,9	30788,5 $\pm$ 3018,4	4

En conclusión, estos estudios sobre la depuración de IgG en ratones transgénicos BAC confirmaron que no existía mayor carencia del $\beta 2m$ y también que la cadena $-\alpha$ de FcRn bovino formaba un complejo funcional con el $\beta 2m$ de ratón. La depuración de mlgG1 se redujo significativamente en ratones Tg, indicando que la cantidad de FcRn híbrido y de ratón disponible para la protección de los anticuerpos administrados contribuye al grado de protección contra la depuración *in vivo*. Además, no existía diferencia alguna entre los datos de depuración de la IgG humana y de ratón en los animales Tg, indicando que el receptor $\beta 2m$ de cadena $-\alpha$ de bFcRn híbrido puede rescatar hlgG1 también.

Ejemplo 5: Inmunización con ovoalbúmina

La #14 homocigota, la #19 hemicigota (que codifican 4 y 5 copias de bFCGRT, respectivamente) y ratones wt de edad y sexo (macho) coincidentes (cinco en cada grupo) fueron inmunizados vía intraperitoneal con 250 μ g de ovoalbúmina (OVA, Sigma-Aldrich, Budapest, Hungría) en adyuvante completo de Freund (CFA) y fueron desafiados 14 días más tarde con 250 μ g de OVA con adyuvante incompleto de Freund (IFA, Sigma-Aldrich, Budapest, Hungría).

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Animal Care and Ethics Committee of the Agricultural Biotechnology Center, Gödöllő, Hungría.

15 *Títulos de IgG e IgM específicos del antígeno*

Para descubrir las consecuencias inmunológicas de la sobreexpresión de bFcRn más allá de la protección de IgG, ratones wt y Tg (#14 y #19) fueron inmunizados, desafiados 2 semanas más tarde con OVA y se midieron sus títulos de IgG e IgM anti-OVA en suero. Se tomaron durante 56 días muestras de sangre (50 μ l/cada vez) del plexo retro-orbital. Los sueros se ensayaron en busca de OVA así como de IgM e IgG específicas de FITC. Un ELISA cuantitativo empleando OVA y FITC-albúmina (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungría) como reactivos de captura y una IgG anti-ratón de cabra así como una IgM anti-ratón de cabra policlonal purificada por afinidad conjugada con HRP (específica de la cadena γ y μ) (Southern Biotech Associates Inc., Birmingham, AL, USA) como reactivo de detección, se utilizaron para evaluar las concentraciones en plasma de IgG e IgM de ratón anti-FITC y anti-OVA durante los experimentos. El anticuerpo conjugado con peroxidasa se detectó mediante TMB (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungría) como sustrato. Se aplicaron diluciones seriales de cada muestra de suero de prueba y las concentraciones de Ig se reportaron en base a los valores de absorbancia a 450 nm interpolados de una porción lineal de la curva dosis-respuesta. Se ensayaron las muestras por duplicado. Se utilizó la prueba t de Student de dos colas para evaluar la significancia estadística de los valores medios de los grupos de tratamiento. Se consideró que los valores eran significativamente diferentes si $p \leq 0,05$.

Los resultados mostraron que no existía diferencia entre los animales wt y Tg durante la respuesta inmune primaria; sin embargo, después de la inmunización de refuerzo, los títulos de IgM e IgG específicos de OVA fueron notablemente diferentes. Durante la respuesta a anticuerpo secundaria, los títulos de IgM mostraron una curva típica en los animales wt ya que había un pico de IgM ligeramente más bajo en comparación con el de la respuesta inmune primaria. Por otra parte, en el caso de los ratones Tg, los títulos de IgM eran superiores en la respuesta inmune secundaria en comparación con los de la respuesta inmune primaria, y significativamente más altos en comparación con los ratones wt (**Fig. 7A**). En cuanto a los títulos de IgG, los títulos de IgG específicos de OVA se triplicaron casi en los ratones Tg en comparación con los animales wt durante la respuesta inmune secundaria (Fig. 7B).

Perfil de subclase de IgG

A continuación se determinó el perfil de subclase de IgG de las inmunoglobulinas en suero específicas de OVA. A los 32 días después de la inmunización, los sueros de ratones wt y Tg (#14) se ensayaron en busca de isotipos de IgG específicos de OVA. Un ELISA cuantitativo empleando OVA como reactivos de captura y las IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 anti-ratón de cabra policlones purificadas por afinidad conjugadas a HRP (Southern Biotech Associates Inc., Birmingham, AL, USA) como reactivo de detección, se utilizaron para evaluar las concentraciones en plasma de los isotipos de IgG anti-OVA. Se detectó el anticuerpo conjugado con peroxidasa utilizando TMB como sustrato. Se aplicaron diluciones seriales de cada muestra de suero de prueba y las concentraciones de Ig se reportaron en base a los valores de absorbancia a 450 nm interpolados de una porción lineal de la curva dosis-respuesta. Se ensayaron las muestras por duplicado.

Se descubrió que los animales inmunizados con OVA-CFA y luego OVA-IFA mostraban predominantemente la subclase IgG1 de anticuerpos anti-OVA. Los datos mostraron que los ratones Tg generaban títulos de IgG1, IgG2a e IgG2b específicos de OVA significativamente más altos. Aunque los ratones Tg generaran IgG3 ligeramente más alta en comparación con la de los ratones wt, la diferencia no era significativa debido a una gran desviación estándar en los resultados. Los presentes datos mostraron también que los isotipos de IgG específicos de OVA estaban proporcionados de forma similar a los de los ratones wt (**Fig. 7C**). Ello indica que, aparte de las diferencias en la cantidad, la expresión de bFcRn en los ratones Tg no modificó la respuesta inmune específica de OVA.

55 *Niveles totales de IgG*

Un ELISA cuantitativo empleando un anticuerpo policlonal anti-ratón de cabra purificado por afinidad no marcado (IgG anti-ratón de cabra (H+L); Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA) como reactivo

de captura y una IgG anti-ratón de cabra policlonal purificada por afinidad conjugada con peroxidasa de rábano (específica de la cadena γ ; Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL, USA) como reactivo de detección, se utilizaron para evaluar las concentraciones en plasma de IgG de ratón durante el experimento. El anticuerpo conjugado con peroxidasa se detectó mediante TMB (Sigma) como sustrato. Se ensayaron las muestras por duplicado.

- 5 El análisis de los niveles totales de IgG mostró que los ratones Tg (#14) produjeron cantidades significativamente más altas de IgG en comparación con los ratones wt aun antes de la inmunización ($2,4 \pm 0,4$ y $4,8 \pm 0,5$ mg/ml, media $\pm$ SEM, en ratones wt y Tg, respectivamente; $p < 0,01$). Después de la inmunización, el nivel total de IgG subió constantemente y alcanzó sus niveles máximos los días 28 y 36 en los animales wt y Tg, respectivamente. Sin embargo, encontramos una diferencia notable y significativa en los niveles más altos de IgG, que eran de $14,8 \pm 2,6$ mg/ml (media $\pm$ SEM) y $39,9 \pm 2,7$ mg/ml en los ratones wt y Tg, respectivamente ($p < 0,001$) (**Fig. 7D**).

Ensayo de fagocitosis

- 15 Para evaluar la integridad funcional de la IgG específica de OVA generada en los ratones Tg, se produjeron complejos de anticuerpos OVA-anti-OVA mediante la incubación de OVA-FITC con cantidades crecientes de sueros de ratones Tg y wt, recogidos el día 35 después de la inmunización con OVA, y se realizó un ensayo de fagocitosis con la línea celular P388D1 de macrófagos de ratón. Se llevó a cabo el marcaje de la OVA con FITC mediante el procedimiento descrito de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Molecular Probes, Eugene, OR). Los macrófagos de ratón de la línea celular P388D1 se cultivaron a 37°C en el medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungría) complementado con suero de ternera fetal al 5% (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungría) y 2×10^5 células / pocillo se trataron a 37°C durante 60 minutos con 15 ng de acetato de forbol-miristato (PMA, 30 ng/ml, Sigma-Aldrich, Budapest, Hungría) en una placa de cultivo celular de 24 pocillos. Para producir el complejo de anticuerpos OVA-anti-OVA, se preincubaron 50 μg de OVA-FITC (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a 37°C durante 60 minutos con 2,5, 10 y 40 μl de suero procedente de ratones Tg y wt inmunizados con OVA (35 días después de la inmunización). Se llevó a cabo la fagocitosis a 37°C durante 90 minutos incubando células P388D1 tratadas con PMA con los complejos de anticuerpos OVA-anti-OVA. Después de un lavado extenso para eliminar las proteínas no unidas, se analizaron las células mediante citometría de flujo (FACS). Se utilizó Azul de Tripano para quitar la OVA marcada con FITC extracelular.

- 25 La eficacia de captación del inmunocomplejo se analizó por FACS. No se encontró fagocitosis potenciada con la utilización de 2,5 μl de sueros ni de ratones Tg ni de ratones wt cuando se comparó con la captación de OVA -FITC no-opsonizada. Sin embargo, se observó una potenciación significativa mediante la utilización de 10 μl de sueros de Tg pero no de ratones wt. Finalmente, 40 μl de sueros procedentes cada uno de ratones Tg y wt resultaron en fagocitosis igualmente incrementada en comparación con la captación del antígeno no-opsonizado (Fig. 7E). Estos datos indicaban que los sueros de ratones Tg contenían significativamente más anticuerpo específico de OVA el día 35 de la inmunización y que estaban funcionalmente intactos.

Ejemplo 6: Los ratones Tg y wt responden de forma similar a la inmunización con FITC-dextrano

- 35 Con el fin de analizar la respuesta inmune que genera principalmente IgM, se inmunizaron vía intraperitoneal ratones Tg y wt con FITC-dextrano y se desafiaron similarmente dos semanas más tarde. Como el FITC-dextrano es un hapteno (FITC) conjugado con un antígeno típico de tipo II independiente de las células T (dextrano) (Mond y col., 1995), se observó en primer lugar IgM específica de FITC, con muy poca IgG específica de FITC en los sueros. No había diferencia entre los animales Tg y wt con respecto a su respuesta inmune específica de FITC. Al analizar la respuesta inmune durante la inmunización, se observó una producción en aumento de IgM después de la segunda inmunización en los ratones tanto Tg como wt (Fig. 8).

Ejemplo 7: Efecto de la sobreexpresión de bFcRn sobre las células productoras de IgM e IgG específicas de OVA

Análisis de las células B específicas de OVA mediante el ensayo ELISPOT

- 45 Los títulos elevados de IgM específica de OVA en ratones Tg sugerían que la sobreexpresión de bFcRn modificaba la respuesta inmune a la expansión clonal de células B más allá de su contribución al mayor rescate de IgG. Para investigar esta observación, se analizó en primer lugar el número de células en plasma que secretaban IgM anti-OVA e IgG anti-OVA en el bazo 25 días después de la inmunización, mediante el análisis de células B específicas de OVA con un ensayo ELISPOT. Ratones #14 homocigota y wt (tres en cada grupo) fueron inmunizados vía intraperitoneal con 250 μg de OVA en CFA y fueron desafiados 14 días más tarde con 250 μg de OVA con IFA. 25 días después de la primera inmunización, se sacrificaron los animales y se analizaron sus células del bazo en busca de células IgM e IgG específicas de OVA. Para el ELISPOT, se recubrieron placas MultiScreen-HTS (Millipore, Bedford, MA) con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de OVA en PBS a temperatura ambiente durante 3 horas. Luego se lavaron las placas seis veces con PBS y se bloquearon con medio RPMI que contenía un 5% de FCS y mercaptoetanol (500 μM) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron a los pocillos diluciones seriales (empezando por 5×10^5 células / pocillo) de células del bazo. Se incubaron las placas a 37°C con un 5% de CO_2 durante toda la noche y se lavaron seis veces con PBS-Tween: se añadió entonces a cada pocillo IgG anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa de rábano (específica de la cadena pesada γ ; dilución 1:4000 veces; Southern Biotechnology). Tras una hora de incubación a temperatura

ambiente, se lavaron las placas seis veces con PBS-Tween. Entonces se incubaron las placas en presencia de un sustrato cromógeno 3-amino-9-etilcarbazol (AEC; Sigma) y H₂O₂ a temperatura ambiente y la reacción terminó por lavado con agua. Se contaron las unidades formadoras de puntos (SFU) por pocillo con un lector ImmunoScan ELISPOT (Cellular Technology Ltd., USA) y se evaluaron mediante el software ImmunoSpot ver. 3.2 (Cellular Technology Ltd., USA).

El resultado demostró que el número de células productoras de IgM específicas de OVA se duplicó ($p < 0,05$), mientras que las células de IgG específicas de OVA fueron más que triplicadas ($p < 0,001$) en el bazo (**Fig. 9A**).

La inmunización resulta en un influjo masivo de neutrófilos en el bazo

La inmunización con OVA resultó en un incremento en el peso del bazo (Fig. 9B) así como en el número de células (Fig. 9C), también se observó un aumento de los nódulos linfáticos periféricos. Este fenómeno apareció en los ratones wt y también en los Tg; sin embargo, el tamaño del bazo se duplicó en los animales Tg en comparación con los controles wt ($p < 0,001$).

Se caracterizó entonces la distribución del tipo de células del bazo mediante citometría de flujo. Para los FAC, se aislaron los esplenocitos y se incubaron primero con anti-CD32/CD16 (clon 2.4G2) durante 30 minutos. Luego, se incubaron las células con Abs específico conjugado con fluorocromo a 4°C durante 50 minutos en tampón de tinción (PBS con un 0,1% BSA y un 0,1% de azida de sodio), se lavaron dos veces y luego se analizaron utilizando un FACSCalibur provisto del software CellQuest (BD Biosciences, San José, CA). Se obtuvieron mAbs conjugado, CD45R/B220-PECy5, 1-A/1-E-PE, GR-1(Ly-6G)-PE y CD11b-A647 de BD Pharmingen (San Diego, CA). Se compraron CD3-A647, CD86-PE, CD11c-A647 y CD11b-PE a Caltag (Burlingame, CA), eBioscience (San Diego, CA), Serotec (Dusseldorf, Alemania) e ImmunoTools GmbH (Friesoythe, Alemania), respectivamente. Se obtuvieron controles de isotopos de BD Pharmingen o Serotec.

Los resultados demostraron que, después de la inmunización, las relaciones entre las células portadoras de los antígenos CD45R/B220 (linfocitos B) y 1-A/1-E (MHC de clase II) se redujeron específicamente ($p < 0,05$). No había diferencia o una disminución menos radical con respecto a las células portadoras del marcador CD3 (linfocito T) en ratones wt y Tg, respectivamente. Estos fenómenos aparecieron en ratones wt y Tg; sin embargo, estaban más acentuados en los animales Tg (Fig. 10).

Las proporciones entre las células portadoras de los marcadores CD11B y Gr-1 aumentaron drásticamente en los ratones tanto wt como Tg después de la inmunización ($p < 0,001$). Con respecto a la magnitud de este aumento, se encontró un incremento aproximadamente cinco veces más alto en los wt y un incremento nueve veces más alto en ratones Tg. Se descubrió también que la mayoría de las células que expresaban Gr-1 eran Gr-1^{alto} (Fig. 11A), con una posición típica de los granulocitos de acuerdo con los parámetros de dispersión de la luz a ángulo hacia adelante / ángulo lateral (FCS/SSC), sugiriendo que había neutrófilos (datos no mostrados). De nuevo, este aumento era mayor en el caso de ratones Tg ($p < 0,01$) (Fig. 11A). Se descubrió también que la relación entre las células portadoras de los antígenos CD11b y MHC de clase II (macrófagos, células dendríticas) (Fig. 11B) y de los antígenos CD11b y CD11c (células dendríticas) (Fig. 11C - células identificadas y seleccionadas) era significativamente elevada ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente) en los ratones Tg en comparación con sus controles wt. Estos resultados explican la disminución proporcional de las células portadoras de B220 y MHC-II; sin embargo, ello no implica la reducción de los números totales de células en la medida en que el bazo, con su número de células, eran más importantes después de la inmunización (Fig. 9C). En base a estos análisis, se concluyó que la mayoría de las células que aflúan al bazo 25 días después de la inmunización eran neutrófilos; sin embargo también aparecía un número creciente de células dendríticas.

Ejemplo 8: bFcRn se expresa fuertemente en neutrófilos de exudados peritoneales, macrófagos y células dendríticas

La expresión de la cadena- α de bFcRn se analizó primero en células de exudados peritoneales que derivaban de ratones dos días después de haber sido tratados vía intraperitoneal con Concanavalina A (ConA, 100 μ g / ratón en PBS; Sigma-Aldrich, Budapest, Hungría). Para una preparación de células enriquecidas con neutrófilos, se inyectaron i.p. a los ratones 2 ml de caseína al 5% (peso/volumen) (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungría) en solución salina y se aislaron las células peritoneales 6 horas después de la inyección. Los neutrófilos se purificaron entonces mediante centrifugación con Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) (400 x g durante 30 minutos a RT). La pureza del neutrófilo era del ~80% según se determinó por citometría de flujo utilizando reactivos anti-CD11b y anti-Gr-1 (Fig. 12).

Se extrajo ARN total de estas células utilizando el Reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transcribieron a la inversa dos microgramos de ARN mediante la enzima transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV) (Promega) y del cebador adaptador (dT)17 por protocolos estándar. Se realizó la PCR para obtener un amplicón específico de la cadena- α de bFcRn de 422 pb de longitud (289-711 pb de AF139106) mediante los pares de cebadores: B3 5'-CGCAGCARTAYCTGASCTACAA-3' (SEQ ID NO: 37, donde R puede ser G o A, Y puede ser T o C y S puede G o C) y B4 5'-GGCTCCTTCCACTCCAGGTT-3' (SEQ ID NO: 38). El segmento amplificado se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se tiñó con bromuro de etidio.

La expresión de bFcRn se detectó por amplificación por PCR primero en células de exudados peritoneales procedentes de ratones Tg y wt después de haber sido tratados con ConA. La expresión de bFcRn se mostró también en una población de células enriquecidas con neutrófilos y macrófagos, ya que las células purificadas eran ~78% CD11b^{alto} / Gr-1^{alto} y del ~20% CD11b^{alto} / Gr-1 (Fig. 12).

Un estudio más reciente reveló que FcRn desempeña un papel más importante en la fagocitosis mediada por IgG en los monocitos y leucocitos polimorfonucleares (Vidarsson y col., 2006), lo que sugiere que FcRn está implicado en la presentación de antígenos. Basándonos en nuestros datos, se puede suponer que la sobreexpresión de bFcRn en estas células media la fagocitosis potenciada por el antígeno e incluso la presentación del antígeno, lo que resulta entonces en más células plasmáticas productoras de IgM e IgG específicas del antígeno en los órganos linfoides secundarios. Si esta teoría es correcta, esta potenciación era obvia una vez producida la IgG y no antes. En efecto, los títulos de IgM incrementados se encontraron solamente después que apareciera la IgG específica de la OVA, principalmente en la respuesta inmune secundaria.

Ejemplo 9: Presencia de linfocitos-B, neutrófilos y células dendríticas portadoras de OVA en el bazo de ratones inmunes

Un análisis celular demostró que el tipo de células dominantes que afluyeron al bazo después de la inmunización eran neutrófilos. En base a otro informe reciente, los neutrófilos comprendían la principal población de células portadoras del antígeno en los órganos linfoides secundarios; una vez que tuvo lugar una respuesta inmune específica, se formó el inmunocomplejo de IgG-antígeno y contribuyó a la calidad de la respuesta inmune secundaria establecida (Maletto y col., 2006). Para saber si el influjo de neutrófilos era efectivamente dependiente de una respuesta inmune específica del antígeno y portaba antígenos en nuestros experimentos, ratones transgénicos a los 56 días de la inmunización con OVA (cuando el nivel de IgG específica de la OVA sigue siendo alto - Fig. 7B) y sin inmunización, fueron tratados vía intraperitoneal con FITC-OVA.

En este experimento, los ratones (#14 homocigotos) fueron tratados vía intraperitoneal con OVA-FITC (7,4 mg/ml, 100 µl/ratón). 5 horas después de la inyección de OVA-FITC, los ratones fueron esplenectomizados y sus células se analizaron mediante citometría de flujo y microscopía confocal. Para la citometría de flujo, se trataron las células tal como se describe con los siguientes reactivos: CD45R/B220-PECy5, GR-1(Ly-6G)-PE, CD11c-A647, CD11b-A647 y CD11b-PE. Para la microscopía confocal, se tiñeron las células con una sonda de ADN permeable a células fluorescentes en rojo DRAQ5 (Biostatus Ltd., Reino Unido) durante 10 minutos a T ambiente. Después de una etapa de lavado, se registraron las imágenes IDC y de fluorescencia (512 x 512 píxeles) con un microscopio confocal de exploración láser Olympus FLUOView500 (Hamburgo, Alemania) de gran aumento (objetivo de 63X). Se utilizaron las líneas láser de argón de 488 nm y de láser He-Ne de 632 para excitar FITC y los tintes DRAQ5.

Los datos de la citometría de flujo demostraron que entre las células positivas a OVA-FITC (15,1 ± 1,4%), 61,2 ± 5,4% eran positivas a B220 (linfocitos B), 18,5 ± 0,6% se detectaron como siendo CD11b^{alto} y Gr-1^{alto} (neutrófilos) y 13,5 ± 2,1% fueron células (dendríticas) positivas a CD11b y CD11c en los animales inmunizados con OVA. No encontramos un número considerable de células positivas a OVA-FITC en animales no inmunizados (2,1 ± 0,3%) (Fig. 13A y 13B). Los datos de la citometría de flujo, con respecto a los linfocitos-B y neutrófilos positivos a OVA-FITC, se confirmaron mediante microscopía confocal. Se encontraron neutrófilos típicos que tienen OVA-FITC que internalizan los núcleos polilobulados, mientras otras células, probablemente los linfocitos B (que tienen núcleos de forma redonda, grandes y bordes delgados de citoplasma) se recubrieron con OVA-FITC (Fig. 13C). No se encontró una diferencia significativa en el tamaño del bazo ni en los números de células entre los animales inmunizados y no inmunizados (datos no mostrados). Este descubrimiento se ajusta bien a los demás resultados encontrados y explica por qué existe un influjo notable de neutrófilos positivos a CD11b y a Gr-1 en los ratones wt y Tg 25 días después de la inmunización. Considerando que los ratones Tg producen mucho más IgG específica de la OVA (Fig. 7B) y sobreexpresan FcRn en estas células (Fig. 12), podemos explicar también por qué los ratones Tg muestran un mayor influjo de estas células en el bazo, mayor expansión clonal de células B específicas del antígeno y por consiguiente una fuerte respuesta inmune.

Ejemplo 10: Generación de ratones transgénicos bFcRn por transgénesis lentiviral (ejemplo preparatorio)

Se utilizaron recientemente vectores lentivirales derivados de VIH y EIAV para obtener altas velocidades de transgénesis reproducible en ratones (Pfeifer y col., 2002), ratas (Lois y col., 2002), pollos (McGrew y col., 2004), cerdos (Hofmann y col., 2003; Whitelaw y col., 2004) y bovinos (Hofmann y col., 2004). El vector de transferencia WPRE-P2_bFcRn se produjo mediante sustitución del segmento original EF1α-EGFP del vector de transferencia pWPTS-EGFP (Bovia y col., 2003) por un segmento promotor de 2950 pb de longitud combinado artificialmente del gen de cadena-α de FcRn bovino (bFcRn) con secuencia codificante del mismo gen. El segmento promotor de bFcRn fue amplificado por PCR con polimerasa Deep Vent (New England Biolab, Beverly, MA, USA) a partir del clon de BAC #128E04 que contiene el gen de cadena-α de bFcRn y se utilizó para elaborar los ratones transgénicos bFcRn (véase el Ejemplo 2). El cebador hacia adelante contiene un sitio XbaI (en cursiva) (lenti-BORE20: 5-GGG TCT AGA ACA CCA AGG GCG GCA TCA-3, SEQ ID NO: 39); el cebador inverso contiene un sitio EcoRI (lenti-BORE18: 5-GGG GAA TTC CGG CTC CCG TGA CTG GAG AC-3, SEQ ID NO: 40). El amplicón generado por PCR tenía una longitud de 2950 pb de la secuencia reguladora de bFCGRT (GenBank: pares de bases nucleotídicas 765455 - 762510 del clon NW 001493624.1 / Bt18 WGA2132 3 / contig genómico del cromosoma 18 de Bos taurus, montaje de referencia (basado en Btau_3.1). El segmento codificante de la cadena pesada de bFcRn se amplificó por PCR con polimerasa Deep Vent a partir de un

clon que contenía el ADNc de bFcRn (GenBank AF139106) y que se había utilizado previamente para elaborar células transfectadas de forma estable en nuestro laboratorio (Kacskovics y col., 2006a). El cebador hacia adelante contiene un sitio EcoRI (BORE10: 5-GGG GAA TTC TGG GGC CGC AGA GGG AAG G-3, SEQ ID NO: 41); el cebador inverso contiene un sitio MluI (lenti-BORE19: 5-GGG ACG CGT GAG GCA GAT CAC AGG AGG AGA AAT-3, SEQ ID NO: 42). El amplicón generado por PCR era de una longitud de 1285 pb del ADNc de cadena- α de bFcRn (GenBank: nucleótido 64 - 1344 de la secuencia de referencia NM_176657 del bFcRn). Después de la purificación, los dos amplicones (promotor y secuencia codificante del bFcRn) fueron digeridos con EcoRI (Promega) y ligados mediante la utilización de ligasa T4 (Promega) para producir un constructo P2-bFcRn que codifica un segmento de 2950 pb del promotor de cadena pesada de bFcRn y un segmento de 1285 pb del ADNc de cadena pesada de bFcRn (SEQ ID NO: 43). El fragmento de ADNc del promotor de bFcRn se insertó entonces en el plásmido del vector de transferencia pWPTS. Los vectores se amplificaron mediante transfección transitoria en células 293T tal como se ha descrito anteriormente (Bovia y col., 2003). Los vectores utilizados para crear el lentivirus se obtuvieron de Tronolab, Cantonal Medical University, Ginebra, Suiza. Se utilizaron los siguientes vectores: pMD.G (constructo de envoltorio, 6kpb); pCMV R8.91 (constructo de empaquetado, 12kpb); pWPTS (constructo de transferencia, 12,7kpb), en los que la secuencia de ADNc del promotor de FcRn (P2)-FcRn se insertó entre los sitios ClaI y SalI. Se evaluaron los títulos lentivirales mediante la traducción de células Jurkat con diluciones seriales de sobrenadantes de un stock de virus preparado en paralelo. Este virus contenía el vector de transferencia pWPRE-EGFP. Se contaron las células GFP+ mediante el clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS). El título se encontraba en el rango de 10^7 - 10^8 unidades de transducción por mililitro. Se crearon ratones transgénicos mediante la inyección del lentivirus VIH-P2-FcRn en el espacio perivitelino de los cigotos de una etapa celular. Se realizaron microinyecciones en fondos genéticos FVB/N y Balb/c, se transfirieron entonces los cigotos inyectados a hembras receptoras (Tabla 6). Los fundadores transgénicos fueron identificados por PCR con los siguientes cebadores: bFcSuf 5' CTCCTTTGTCTTGGGCACTT 3' (SEQ ID NO: 9) y bFcL 5' GCCGCGGATCCCTTCCCTCTG 3' (SEQ ID NO: 10).

Tabla 6 Datos sobre embriones de rata inyectados con lentivirus

	FVB/N	Balb/c
Embriones inyectados y transferidos	37	38
Nº de hembras receptoras	2	3
Transferencias con éxito	2	1
Nº de recién nacidos	17 ó 18	4
Recién nacidos vivos	13	4
PCR+ (transgénica)	5	1

25

Para detectar la expresión del transgén, se realizó una RT-PCR en las muestras de ARN aisladas de hígado, bazo, pulmón e intestino de un ratón con VIH-P2-FcRn recién nacido tal como se muestra en la Fig. 14. Los cebadores previstos para el promotor P2 (FcRnprf: CGGCCACCTCTATCACATTT, SEQ ID NO: 3; FcRnpr: TGCATTGACCACACTTGGTT, SEQ ID NO: 4; tamaño esperado del fragmento: 579 pb) se incluyeron para excluir la posibilidad de contaminación del ADN genómico en las muestras de ARN, y el ARNm específico del transgén se detectó con los cebadores previstos para el exón 4 de FcRn bovino (bFcRnex4f: CCAAGTTTGCCCTGAACG, SEQ ID NO: 19; bFcRnex4r: GAGGCAGATCACAGGAGGAG, SEQ ID NO: 44, tamaño esperado del fragmento: 161 pb). Los resultados indican claramente la expresión del ARNm de bFcRn.

Los fundadores transgénicos se reproducen individualmente por apareamiento con ratones de tipo salvaje para establecer líneas transgénicas.

Ejemplo 11: El nivel de albúmina aumenta también en el suero de ratones Tg (ejemplo de fondo)

Debido a que los ratones transgénicos sobreexpresan bFcRn, se investigaron dos puntos: (1) si bFcRn interactúa con la albúmina de ratón y (2) si existen influencias sobre el metabolismo de la albúmina. Por tanto, los niveles de albúmina de ratones que no expresan FcRn (FcRn KO - comprados a The Jackson Laboratory, USA), animales wt, #14 y #19 homocigotas (expresan 4 y 10 copias del bFcRn, respectivamente) se midieron mediante la utilización del ELISA sándwich específico de la albúmina. En base a este estudio, se descubrió que bFcRn se une a la albúmina y que influye seriamente en su nivel de suero (Fig. 15). El contenido de albúmina en la leche de los ratones transgénicos se midió también y se descubrió que contiene una concentración significativamente más alta en comparación con sus controles de tipo salvaje (datos no mostrados). Así, estos datos sugieren que, aparte del efecto ventajoso de la sobreexpresión de FcRn en la respuesta inmune humoral, la concentración de albúmina también es elevada, lo que puede resultar nocivo, ya que el nivel de presión osmótica en la sangre es más alto de lo normal, aunque incluso a un número de 10 copias no existían efectos nocivos perceptibles y los animales Tg vivieron una larga y sana vida hasta los 14 meses.

Ejemplo 12: Estudio *in vivo* que analiza la vida media de la IgG de conejo en ratones KO con FcRn de ratón - transgénicos con BAC bovino (ejemplo de fondo)

Para analizar si el bFcRn se une a la IgG de conejo y la protege contra una depuración rápida, analizamos la vida media de la IgG de conejo en ratones KO con FcRn de ratón - transgénicos con BAC bovino. Se crearon ratones transgénicos con FcRn bovino, nulos de cadena- α de FcRn de ratón (bFcRn/mFcRn^{-/-}) mediante cruzamiento de ratones homocigotos bFcRn (#14) portadores de 4 copias del transgén de BAC 128E04 (Bender y col., 2007) con la cepa de ratón homocigoto para el alelo noqueado de mFcRn. Se compró esta cepa de ratón a The Jackson Laboratories (USA) bajo el nombre: B6.129X1-Fcgn^{cm1Der/Der}. Ratones transgénicos dobles con el genotipo deseado (bFcRn/mFcRn^{-/-}) fueron seleccionados por PCR multiplex con los siguientes cebadores: NEO-F: GGA ATT CCC AGT GAA GGG C (SEQ ID NO: 45); NEO-R: CGA GCC TGA GAT TGT CAA GTG TAT T (SEQ ID NO: 46); FcRn wt-F: GGG ATG CCA CTG CCC TG (SEQ ID NO: 47); bFcSuF: CTC CTT TGT CTT GGG CAC TT (SEQ ID NO: 9); bFcL: GCC GCG GAT CCC TTC CCT CTG (SEQ ID NO: 10). Un ratón F2 adecuado se identificó tal como se muestra en la Fig. 16A.

La vida media de la IgG de conejo se analizó esencialmente tal como se describe en el Ejemplo 4. Brevemente, después de un sangrado previo, ratones de edad, peso y sexo (macho) coincidentes con mFcRn^{-/-} y bFcRn^{+/+}/mFcRn^{-/-} (tres en cada grupo) fueron microinyectados vía intravenosa con 150 μ g de IgG de conejo (Sigma) en 50 mg/ml de solución salina y durante las siguientes 216 horas, se recogieron muestras periódicas de sangre (50 μ l cada vez) del plexo retro-orbital. Se utilizó un ELISA cuantitativo que empleaba IgG anti-conejo de cabra (específico de H+L) (Caltag) como reactivo de captura y una IgG anti-conejo de cabra conjugada con HRP (específico de H+L) (Vector Laboratories) como reactivo de detección para evaluar las concentraciones en plasma de IgG de conejo durante el experimento. El anticuerpo conjugado con peroxidasa se detectó por medio de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina; Sigma) como sustrato. Se ensayaron las muestras por duplicado. Las concentraciones de IgG de conejo se reportaron en base a un estándar de referencia. La IgG de conejo se depuró rápidamente en los ratones FcRn^{-/-} (vida media: 15 horas), pero se protegió en bFcRn/FcRn^{-/-} (vida media: 67 horas) (Fig. 16B). La depuración rápida de IgG en los animales FcRn^{-/-} está documentada (Roopenian y col., 2003) y también en los animales que son carentes de FcRn funcional debido a la falta de la beta-2-microglobulina (Ghetie y col., 1996; Israel y col., 1996; Junghans y Anderson, 1996). En nuestro experimento, la depuración de la IgG de conejo se redujo significativamente ($p < 0,0001$) en los animales bFcRn/mFcRn^{-/-} debido a la actividad del bFcRn. Sin embargo, la vida media de la IgG de conejo en estos animales sigue siendo mucho más corta en comparación con la vida media de la IgG de conejo en conejo (vida media: 132-153 horas) (Andersen y Bjorneboe, 1964; Dima y col., 1983; Sabiston y Rose, 1976) o en ratón (vida media: 106 horas) (Dima y col., 1983), lo que sugiere que la interacción de la IgG de conejo y el complejo bFcRn / beta-2-microglobulina es relativamente débil. Efectivamente, datos previos detectaron diferencias en las interacciones IgG - FcRn a través de las especies (Ober y col., 2001), acentuando la necesidad de selección experimental del FcRn apropiado para aumentar la vida media de la IgG y consecuentemente su nivel a la inmunización.

Ejemplo 13: Creación de conejos transgénicos dobles que están produciendo inmunoglobulinas humanizadas y que sobreexpresan el FcRn bovino mediante cruzamiento (ejemplo preparatorio)

Las líneas transgénicas dobles de conejo que producen IgG humana y FcRn bovino son buenos candidatos para mejorar el nivel de inmunoglobulina en el suero. El efecto del FcRn bovino sobreexpresado en la vida media de la IgG humana se ha mostrado anteriormente, por tanto estas líneas transgénicas dobles de conejo son muy útiles para la producción de antisueros policlonales, o como punto de partida para generar anticuerpos monoclonales de conejo.

El conejo Tg doble se puede generar mediante cruzamiento estándar. Aunque el experimento anterior mostró que bFcRn no es el mejor candidato con respecto a la unión a la IgG de conejo, la generación de un conejo transgénico bFcRn sigue siendo una etapa intermedia deseable para crear el conejo transgénico doble que produce tanto la IgG humana como el FcRn bovino. En una etapa posterior, se pueden cruzar dos líneas de conejos Tg, cada uno conteniendo uno de los transgenes, con el fin de generar el animal final.

El clon BAC bovino 128E04 se introdujo mediante microinyección pronuclear en cigotos de conejo y se generó un fundador transgénico. La presencia del gen FcRn bovino se detectó por PCR, con cebadores diseñados para amplificar un fragmento de 160 pb procedente del exón 4 de FCGRT bovino: bFcRnex4F: 5'-CCAAGTTTGCCCTGAACG - 3' (SEQ ID NO: 19) y bFcRnex4R: 5'-GTGTGGGCAGGAGTAGAGGA - 3' (SEQ ID NO: 20). La Fig. 17 muestra la presencia del fragmento tal como se espera.

Camadas F1 del conejo fundador serán adecuadas para cruzarse con conejos genéticamente modificados que producen inmunoglobulinas humanizadas (Thorey y col., 2006) para que resulten animales transgénicos dobles adecuados para niveles potenciados de producción de anticuerpos policlonales humanizados.

Ejemplo 14: Creación de conejos transgénicos dobles que están produciendo inmunoglobulinas humanizadas y que sobreexpresan el FcRn bovino (ejemplo preparatorio)

Como alternativa al Ejemplo 13, se pueden generar líneas transgénicas dobles de conejo mediante la utilización de conejos transgénicos que producen inmunoglobulinas humanizadas (Thorey y col., 2006) como animales receptores en experimentos similares de transgénesis tal como se describe en el Ejemplo 3. Por medio del clon BAC bovino 128E04, se generan líneas transgénicas de conejo mediante microinyección pronuclear. Los conejos

transgénicos se identifican mediante Southern blot y/o PCR utilizando cebadores y sondas específicas del clon BAC bovino, y se evalúan las vidas medias de las IgG humanas inyectadas. Una vida media sustancialmente más larga en los sueros de los conejos indica que el FcRn bovino introducido protege la inmunoglobulina humana producida por el conejo transgénico de la degradación.

5 Ejemplo 15: Aislamiento y caracterización de un clon BAC que contiene el gen de cadena- α de FcRn de conejo (ejemplo de fondo)

Como muchos de los estudios anteriores sobre la actividad de FcRn utilizaban el conejo como animal modelo, se presumió que el FcRn de conejo era expresado por células endoteliales entre otros tejidos y contribuía a la homeostasis de la IgG. Por tanto, la adición de copias suplementarias del gen de FcRn de conejo resulta en una vida media incrementada de la IgG. Consecuentemente, el FcRn de conejo se clonó y secuenció (SEQ ID NO: 48).

En un esfuerzo paralelo, el clon de BAC de conejo 262E02 se aisló de una librería de BAC de conejo (Rogel-Gaillard y col., 2001). La librería de BAC se construyó en el vector pBeloBAC11, se preparó el ADN de alto peso molecular a partir de glóbulos blancos de un conejo de Nueva Zelanda. La librería de BAC de conejo es manejada por el centro de recursos del INRA para animales domésticos y su disponibilidad es pública. Los cebadores específicos del gen FCGRT de conejo: OCU_FCGRT_F: GGGACTCCCTCCTTCTTGT (SEQ ID NO: 49) y OCU_FCGRT_R: AGCACTTCGAGAGCTTCCAG (SEQ ID NO: 50) fueron proyectados por el programa Primer 3 (http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/lccare/cgi-bin/primer3_aTg.cgi.pl) sobre las etiquetas (tag) de secuencias expresadas por el conejo (EST). Se identificó EB377775 mediante su alineamiento con el gen FCGRT humano (GenBank NM_004107), con el programa lccare (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/lccare/>). La secuencia EB 377775 EST es idéntica a la parte correspondiente del ADNc de FcRn de conejo (SEQ ID NO: 55). Se analizó el clon BAC de conejo 262E02 en busca de la presencia de genes candidatos basados en el cromosoma ortólogo *Bos Taurus*. Los cebadores se proyectaron para las EST de *Oryctolagus cuniculus* o se utilizaron cebadores específicos del gen bovino en la proximidad de 50 kb del gen FCGRT en las direcciones 5' y 3'. Se identificaron los siguientes genes de conejo en el clon BAC 262E02: RPL13A; RPS11; FCGRT; RCN3, PRRG2 (véase la Fig. 18).

25 **Tabla 7 Cebadores y condiciones de PCR para evaluar la presencia de genes bovinos ortólogos en el clon BAC de conejo 262E02**

Gen putativo	Cebador	Tm (°C)	Producto (bp)
PRRG	PRRG2_L: 5'-GTTGTTACACCAGGGAACC-3' (SEQ.ID.NO.: 25) PRRG2_R: 5'-CCTTTGCCATTGTAGATGTAGC-3' (SEQ.ID.NO.: 26)	61	295
RCN3	RCN3_L: 5'-GACGCCGAGACCTACAAGAA-3' (SEQ.ID.NO.: 51) RCN3_R: 5'-CATGTGCGGGAACCTCCTC-3' (SEQ.ID.NO.: 52)	61	168
FCGRT	FCGRT_L: 5'-CTGAACGGTGAGGACTTCAT-3' (SEQ.ID.NO.: 53) FCGRT_R: 5'-GCTCCTTCCACTCCAGGTT-3' (SEQ.ID.NO.: 54)	61	210
RPS11	RPS11_L: 5'-AGATCGGCGACATCGTCA-3' (SEQ.ID.NO.: 55) RPS11_R: 5'-TCTGGAAGTCTTCTTGGTG-3' (SEQ.ID.NO.: 56)	61	108
RPL13A	RPL13A_L: 5'-CATGAGGTGGGCTGGAAGTA-3' (SEQ.ID.NO.: 57)	61	82

	RPL13A-R: 5'-TCCGGTAGTGGATCTTAGCC-3' (SEQ.ID.NO.: 58)		
--	--	--	--

Se detectó también la presencia del gen FLT3LG en base a un análisis slot-blot cuando un producto de PCR FLT3LG bovino de 547 pb de longitud producido por los cebadores: FLT3LG_L: 5'-TCGGAGATGGAGAACTGCT-3' (SEQ ID NO: 15) y FLT3LG_R: 5'-CTGGACGAAGCGAAGACAG-3' (SEQ ID NO: 16) se hibridó al BAC de conejo 262E02 resultando una fuerte señal positiva en condiciones de alta astringencia.

La estructura del clon BAC de conejo 262E02 parece muy similar a la del clon BAC bovino 128E04 de bovino, por tanto, se puede esperar que proporcione buenos resultados similares en experimentos de transgénesis.

Ejemplo 16: Creación de conejos transgénicos que sobreexpresan el FcRn de conejo y estudios *in vivo* para analizar las vidas medias de la IgG de conejo (ejemplo preparatorio)

Un constructo genético que contiene ya sea el clon BAC de conejo 262E02 caracterizado en el ejemplo anterior o un constructo que comprende el ADNc de FcRn de conejo (SEQ ID NO: 48) dirigido por el promotor de bFcRn bien caracterizado y complementado aguas abajo del ADNc de FcRn de conejo por un intrón heterólogo y una región SV40 polyA comercialmente disponible se introduce mediante microinyección pronuclear en cigotos de conejo. Alternativamente, se podrían crear conejos transgénicos con el constructo de ADNc de P2-FcRn de conejo insertado en un vector de transferencia lentiviral tal como se describe en el Ejemplo 10 y ser inyectado en el espacio perivitelino de embriones de conejo. Los conejos transgénicos se identifican por Southern blot y/o PCR utilizando cebadores / sondas específicas. Las vidas medias de IgG en conejos transgénicos que sobreexpresan el FcRn de conejo se evaluaron mediante métodos estándar, por ejemplo los ilustrados anteriormente.

Los conejos transgénicos que sobreexpresan la cadena- α de FcRn de conejo así producidos se pueden utilizar ventajosamente para la producción potenciada de antisueros policlonales.

Referencias

- Abbas A. K. and Lichtman A. H. (2003) Cellular and molecular immunology. WB Saunders Co, Philadelphia.
- Adamski F. M., King A. T. and Demmer J. (2000) Expression of the Fc receptor in the mammary gland during lactation in the marsupial *Trichosurus vulpecula* (brush-tail possum). *Mol Immunol* 37, 435-44.
- 5 Ahouse J. J., Hagerman C. L., Mittal P., Gilbert D. J., Copeland N. G., Jerkins N. A. and Simister N. E. (1993) Mouse MHC class I-like Fc receptor encoded outside the MHC. *J Immunol* 151, 6076-88.
- Akilesh S., Christianson G. J., Roopenian D. C. and Shaw A. S. (2007) Neonatal FcR Expression in Bone Marrow-Derived Cells Functions to Protect Serum IgG from Catabolism. *J Immunol* 179, 4580-8.
- (Andersen J. T., Dee Qian J. and Sandlie I. (2006) The conserved histidine 166 residue of the human neonatal Fc receptor heavy chain is critical for the pH-dependent binding to albumin. *Eur J Immunol* 36, 3044-51.
- 10 Andersen S. B. and Bjorneboe M. (1964) Gamma Globulin Turnover in Rabbits before and During Hyperimmunization. *J Exp Med* 119, 537-46.
- Anderson C. L., Chaudhury C., Kim J., Bronson C. L., Wani M. A. and Mohanty S. (2006) Perspective - FcRn transports albumin: relevance to immunology and medicine. *Trends Immunol* 27, 343-8.
- 15 Antohe F., Radulescu L., Gafencu A., Ghetie V. and Simionescu M. (2001) Expression of functionally active FcRn and the differentiated bidirectional transport of IgG in human placental endothelial cells. *Hum Immunol* 62, 93-105.
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. and Struhl K. (1998) Current protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons., Hoboken, NJ, USA.
- Beers M. H. and Berkow R. (1999) The Merck Manual of Diagnosis and Therapy. Merck Research Laboratories, New York, N.J.
- 20 Bender B., Bodrogi L., Mayer B., Schneider Z., Zhao Y., Hammarstrom L., Eggen A., Kacskovics I. and Bosze Z. (2007) Position independent and copy-number-related expression of the bovine neonatal Fc receptor alpha-chain in transgenic mice carrying a 102 kb BAC genomic fragment. *Transgenic Res* 16, 613-27.
- Bender B., Bodrogi L., Yaofeng Z., Kacskovics I., Hammarstrom L. and Bösze Z. (2004) Generation of bovine FcRn alpha chain BAC transgenic mice. *Tissue Antigens* 64, 374-375.
- 25 Borvak J., Richardson J., Medesan C., Antohe F., Radu C., Simionescu M., Ghetie V. and Ward E. S. (1998) Functional expression of the MHC class 1-related receptor, FcRn, in endothelial cells of mice. *Int Immunol* 10, 1289-98.
- Bovia F., Salmon P., Matthes T., Kvell K., Nguyen T. H., Werner-Favre C., Barnet M., Nagy M., Leuba F., Arrighi J. F., Piguat V., Trono D. and Zubler R. H. (2003) Efficient transduction of primary human B lymphocytes and nondividing myeloma B cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Blood* 101, 1727-33.
- 30 Brambell F. W. R. (1958) The passive immunity of the young mammal. *Biological Reviews* 33, 488-531.
- Brambell F. W. R., Hemmings W. A. and Morris I. G. (1964) A theoretical model of gammaglobulin catabolism. *Nature* 203, 1352-1355.
- Butler J. E. (2006) Why I agreed to do this. *Dev Comp Immunol* 30, 1-17.
- 35 Chaudhury C., Brooks C. L., Carter D. C., Robinson J. M. and Anderson C. L. (2006) Albumin binding to FcRn: distinct from the FcRn-IgG interaction. *Biochemistry* 45, 4983-90.
- Chaudhury C., Mehnaz S., Robinson J. M., Hayton W. L., Pearl D. K., Roopenian D. C. and Anderson C. L. (2003) The Major Histocompatibility Complex-related Fc Receptor for IgG (FcRn) Binds Albumin and Prolongs Its Lifespan. *The Journal of Experimental Medicine* 197, 315-322.
- 40 Cibelli J. B., Stice S. L., Golueke P. J., Kane J. J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de Leon F. A. and Robl J. M. (1998) Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol* 16, 642-6.
- Claypool S. M., Dickinson B. L., Wagner J. S., Johansen F. E., Venu N., Borawski J. A., Lencer W. I. and Blumberg R. S. (2004) Bidirectional transepithelial IgG transport by a strongly polarized basolateral membrane Fcγ receptor. *Mol Biol Cell* 15, 1746-59.
- 45 Cowan P. J., Tsang D., Pedic C. M., Abbott L. R., Shinkel T. A., d'Apice A. J. and Pearse M. J. (1998) The human ICAM-2 promoter is endothelial cell-specific in vitro and in vivo and contains critical Sp1 and GATA binding sites. *J Biol Chem* 273, 11737-44.

- Dickinson B. L., Badizadegan K., Wu Z., Ahouse J. C., Zhu X., Simister N. E., Blumberg R. S. and Lencer W. I. (1999) Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line. *J Clin Invest* 104,903-11.
- Dima S., Medesan C., Mota G., Moraru I., Sjoquist J. and Ghetie V. (1983) Effect of protein A and its fragment B on the catabolic and Fc receptor sites of IgG. *Eur J Immunol* 13, 605-14.
- 5 Dobie K. W., Lee M., Fantes J. A., Graham E., Clark A. J., Springbett A., Lathe R. and McClenaghan M. (1996) Variegated transgene expression in mouse mammary gland is determined by the transgene integration locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6659-64.
- Eggen A., Gautier M., Billaut A., Petit E., Hayes H., Laurent P., Urban C., Plister-Genskow M., Eilertsen K. and Bishop M. D. (2001) Construction and characterization of a bovine BAC library with four genome-equivalent coverage. *Genet Sel*
10 *Evol* 33, 543-8.
- Emanuel S. L. and Pestka S. (1993) Amplification of specific gene products from human serum. *Genet Anal Tech Appl* 10, 144-6.
- Ghetie V., Hubbard J. G., Kim J. K., Tsen M. F., Lee Y. and Ward E. S. (1996) Abnormally short $t_{1/2}$ half-lives of IgG in beta 2-microglobulin-deficient mice. *Eur J Immunol* 26, 690-6.
- 15 Ghetie V. and Ward E. S. (2002) Transcytosis and catabolism of antibody. *Immunol Res* 25,97-113.
- Giraldo P. and Montoliu L. (2001) Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic Res* 10, 83-103.
- Guyton A. C. (1991) Textbook of Medical Physiology. W.B. Saunders Company.
- Hao Y. H., Yong H. Y., Murphy C. N., Wax D., Samuel M., Rieke A., Lai L., Liu Z., Durtschi D. C., Welbern V. R., Price E. M., McAllister R. M., Turk J. R., Laughlin M. H., Prather R. S. and Rucker E. B. (2006) Production of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) over-expressing piglets. *Transgenic Res*.
- 20 Harmsen M. M., Van Solt C. B., Fijten H. P. and Van Setten M. C. (2005) Prolonged in vivo residence times of llama single-domain antibody fragments in pigs by binding to porcine immunoglobulins. *Vaccine* 23, 4926-34.
- Hayes H., Petit E., Lemieux N. and Dutrillaux B. (1992) Chromosomal localization of the ovine beta-casein gene by non-isotopic in situ hybridization and R-banding. *Cytogenet Cell Genet* 61, 286-8.
- 25 Hofmann A., Kessler B., Ewerling S., Weppert M., Vogg B., Ludwig H., Stojkovic M., Boelhauve M., Brem G., Wolf E. and Pfeifer A. (2003) Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep* 4, 1054-60.
- Hofmann A., Zakhartchenko V., Weppert M., Sebald H., Wenigerkind H., Brem G., Wolf E. and Pfeifer A. (2004) Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol Reprod* 71, 405-9.
- 30 Israel E. J., Patel V. K., Taylor S. F., Marshak-Rothstein A. and Simister N. E. (1995) Requirement for a beta 2-microglobulin-associated Fc receptor for acquisition of maternal IgG by fetal and neonatal mice. *J Immunol* 154, 6246-51.
- Israel E. J., Wilsker D. F., Hayes K. C., Schoenfeld D. and Simister N. E. (1996) Increased clearance of IgG in mice that lack beta 2-microglobulin: possible protective role of FcRn. *Immunology* 89, 573-8.
- 35 Janeway Jr. C. A., Travers P., Walport M. and Shlomchik M. J. (2001) Immunobiology: the immune system in health and disease. Garland Publishing, New York, NY.
- Junghans R. P. (1997) Finally! The Brambell receptor (FcRB). Mediator of transmission of immunity and protection from catabolism for IgG. *Immunol Res* 16, 29-57.
- Junghans R. P. and Anderson C. L. (1996) The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulincontaining neonatal intestinal transport receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5512-6.
- 40 Jurka J., Kapitonov V. V., Pavlicek A., Klonowski P., Kohany O. and Walichiewicz J. (2005) Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenet Genome Res* 110, 462-7.
- Kacskovics I., Kis Z., Mayer B., West A. P., Jr., Tiangco N. E., Tilahun M., Cervenak L., Bjorkman P. J., Goldsby R. A., Szenci O. and Hammarstrom L. (2006a) FcRn mediates elongated serum half-life of human IgG in cattle. *Int Immunol* 18, 525-36.
- 45 Kacskovics I., Mayer B., Kis Z., Frenyo L. V., Zhao Y., Muylldermans S. and Hammarstrom L. (2006b) Cloning and characterization of the dromedary (*Camelus dromedarius*) neonatal Fc receptor (drFcRn). *Dev Comp Immunol* 30, 1203-15.

- Kacs Kovics I., Wu Z., Simister N. E., Frenyo L. V. and Hammarstrom L. (2000) Cloning and characterization of the bovine MHC class I-like Fc preceptor. *J Immunol* 164, 1889-97.
- Karlsson R., Michaelsson A. and Mattsson L. (1991) Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J Immunol Methods* 145, 229-40.
- 5 Kobayashi N., Suzuki Y., Tsuge T., Okumura K., Ra C. and Tomino Y. (2002) FcRn-mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 282, F358-65.
- Kohler G. and Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-7.
- 10 Leenaars M. and Hendriksen C. F. (2005) Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *Ilar J* 46, 269-79.
- Lin Z. and Floros J. (2000) Protocol for genomic DNA preparation from fresh or frozen serum for PCR amplification. *Biotechniques* 29,460-2,464,466.
- Lipman N. S., Jackson L. R., Trudel L. J. and Weis-Garcia F. (2005) Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *Ilar J* 46, 258-68.
- 15 Lobo E. D., Hansen R. J. and Balthasar J. P. (2004) Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Pharm Sci* 93, 2645-68.
- Lois C., Hong E. J., Pease S., Brown E. J. and Baltimore D. (2002) Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295, 868-72.
- Lonberg N. (2005) Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol* 23, 1117-25.
- 20 Lu W., Zhao Z., Zhao Y., Hammarström L. and Li N. (2006) Over-expression of the bovine neonatal Fc receptor gene in the mammary gland of transgenic mice. In 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Belo Horizonte, MG, Brasil.
- Lu W., Zhao Z., Zhao Y., Yu S., Zhao Y., Fan B., Kacs Kovics I., Hammarstrom L. and Li N. (2007) Over-expression of the bovine FcRn in the mammary gland results in increased IgG levels in both milk and serum of transgenic mice.
- 25 Immunology 122, 401-8.
- Maletto B. A., Ropolo A. S., Alignani D.O., Liscovsky M. V., Ranocchia R. P., Moron V. G. and Pistoiresi-Palencia M. C. (2006) Presence of neutrophil-bearing antigen in lymphoid organs of immune mice. *Blood* 108, 3094-102.
- Manz R. A., Hauser A. E., Hiepe F. and Radbruch A. (2005) Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol* 23, 367-86.
- 30 Mayer B., Kis Z., Kajan G., Frenyo L. V., Hammarstrom L. and Kacs Kovics I. (2004) The neonatal Fc receptor (FcRn) is expressed in the bovine lung. *Vet Immunol Immunopathol* 98, 85-9.
- Mayer B., Zolnai A., Frenyo L. V., Jancsik V., Szentirmay Z., Hammarstrom L. and Kacs Kovics I. (2002) Redistribution of the sheep neonatal Fc receptor in the mammary gland around the time of parturition in ewes and its localization in the small intestine of neonatal lambs. *Immunology* 107, 288-96.
- 35 McCarthy K. M., Yoong Y. and Simister N. E. (2000) Bidirectional transcytosis of IgG by the rat neonatal Fc receptor expressed in a rat kidney cell line: a system to study protein transport across epithelia. *J Cell Sci* 113, 1277-85.
- McCullough K. C. and Summerfield A. (2005) Basic concepts of immune response and defense development. *Ilar J* 46, 230-40.
- 40 McGrew M. J., Sherman A., Ellard F. M., Lillico S. G., Gilhooley H. J., Kingsman A. J., Mitrophanous K. A. and Sang H. (2004) Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep* 5, 728-33.
- Mond J. J., Lees A. and Snapper C. M. (1995) T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol* 13, 655-92.
- Ober R. J., Martinez C., Lai X., Zhou J. and Ward E. S. (2004) Exocytosis of IgG as mediated by the receptor, FcRn: an analysis at the single-molecule level. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11076-81.
- 45 Ober R. J., Radu C. G., Ghetie V. and Ward E. S. (2001) Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic, antibodies. *Int Immunol* 13, 1551-9.
- Opsahl M. L., Springbett A., Lathe R., Colman A., McClenaghan M. and Whitelaw C. B. (2003) Mono-allelic expression of variegating transgene locus in the mouse. *Transgenic Res* 12, 661-9.

- Palmiter R. D., Wilkie T. M., Chen H. Y. and Brinster R. L. (1984) Transmission distortion and mosaicism in an unusual transgenic mouse pedigree. *Cell* 36, 869-77.
- Peterson N. C. (2005) Advances in monoclonal antibody technology: genetic engineering of mice, cells, and immunoglobulins. *Ilar J* 46, 314-9.
- 5 Petkova S. B., Akilesh S., Sproule T. J., Christianson G. J., Al Khabbaz H., Brown A. C., Presta L. G., Meng Y. G. and Roopenian D. C. (2006) Enhanced half-life of genetically engineered human IgG1 antibodies in a humanized FcRn mouse model: potential application in humorally mediated autoimmune disease. *Int Immunol* 18, 1759-69.
- Pfeifer A. (2006) Lentiviral transgenesis--a versatile tool for basic research and gene therapy. *Curr Gene Ther* 6, 535-42.
- 10 Pfeifer A., Ikawa M., Dayn Y. and Verma 1. M. (2002) Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2140-5.
- Popov S., Hubbard J. G., Kim J., Ober B., Ghetie V. and Ward E. S. (1996) The stoichiometry and affinity of the interaction of murine Fc fragments with the MHC class I-related receptor, FcRn. *Mol Immunol* 33, 521-30.
- Raguz S., Hobbs C., Yague E., Ioannou P. A., Walsh F. S. and Antoniou M. (1998) Muscle-specific locus control region activity associated with the human desmin gene. *Dev Biol* 201, 26-42.
- 15 Rodewald R. (1976) pH-dependent binding of immunoglobulins to intestinal cells of the neonatal rat. *J Cell Biol* 71, 666-9.
- Rogel-Gaillard C., Piumi F., Billault A., Bourgeaux N., Save J. C., Urien C., Salmon J. and Chardon P. (2001) Construction of a rabbit bacterial artificial chromosome (BAC) library: application to the mapping of the major histocompatibility complex to position 12q.1.1. *Mamm Genome* 12, 253-5.
- 20 Roopenian D. C. and Akilesh S. (2007) FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 7, 715-25.
- Roopenian D. C., Christianson G. J., Sproule T. J., Brown A. C., Akilesh S., Jung N., Petkova S., Avanesian L., Choi E. Y., Shaffer D. J., Eden P. A. and Anderson C. L. (2003) The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs. *J Immunol* 170, 3528-33.
- 25 Sabiston B. H. and Rose J. E. (1976) Effect of cold exposure on the metabolism of immunoglobulins in rabbits. *J Immunol* 116, 106-11.
- Sachs U. J., Socher I., Braeunlich C. G., Kroll H., Bein G. and Santoso S. (2006) A variable number of tandem repeats polymorphism influences the transcriptional activity of the neonatal Fc receptor alpha-chain promoter. *Immunology* 119,83-9.
- Sandford A. J. and Pare P. D. (1997) Direct PCR of small genomic DNA fragments from serum. *Biotechniques* 23, 890-2.
- 30 Schedl A., Grimes B. and Montoliu L. (1996) YAC transfer by microinjection. *Methods Mol Biol* 54, 293-306.
- Schnulle P. M. and Hurley W. L. (2003) Sequence and expression of the FcRn in the porcine mammary gland. *Vet Immunol Immunopathol* 91, 227-31.
- Schunk M. K. and Macallum G. E. (2005) Applications and optimization of immunization procedures. *Ilar J* 46, 241-57.
- Simister N. E. and Mostov K. E. (1989) An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature* 337, 184-7.
- 35 Simister N. E. and Rees A. R. (1985) Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. *Eur J Immunol* 15, 733-8.
- Smit A., Hubley R. and Green P. (1996-2004) RepeatMasker Open-3.0.
- 40 Spiekermann G. M., Finn P. W., Ward E. S., Dumont J., Dickinson B. L., Blumberg R. S. and Lencer W. I. (2002) Receptor-mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression of FcRn in the mammalian lung. *J Exp Med* 196, 303-10.
- Stills H. F., Jr. (2005) Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *Ilar J* 46, 280-93.
- 45 Stirling C. M., Charleston B., Takamatsu H., Claypool S., Lencer W., Blumberg R. S. and Wileman T. E. (2005) Characterization of the porcine neonatal Fc receptor--potential use for trans-epithelial protein delivery. *Immunology* 114, 542-53.
- Story C. M., Mikulska J. E. and Simister N. E. (1994) A major histocompatibility complex class I-like Fc receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus. *J Exp Med* 180, 2377-81.

- Sutherland H. G., Kearns M., Morgan H. D., Headley A. P., Morris C., Martin D.I. and Whitelaw E. (2000) Reactivation of heritably silenced gene expression in mice. *Mamm Genome* 11, 347-55.
- Tesson L., Heslan J. M., Menoret S. and Anegon I. (2002) Rapid and accurate determination of zygosity in transgenic animals by real-time quantitative PCR. *Transgenic Res* 11, 43-8.
- 5 Thorey I., Offner S., Ros F., Schueler N., Siewe B., Niersbach H., Buelow R., van Schooten W. and Platzer J. (2006) Expression of a humanized antibody repertoire in transgenic rabbits. In *International Congress of Immunogenomics and Immunomics*, Budapest, Hungary.
- Vidarsson G., Stemerding A. M., Stapleton N. M., Spliethoff S. E., Janssen H., Rebers F. E., de Haas M. and van de Winkel J. G. (2006) FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. *Blood* 108, 3573-9.
- 10 Wakayama T., Perry A. C., Zuccotti M., Johnson K. R. and Yanagimachi R. (1998) Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394, 369-74.
- Whitelaw C. B., Radcliffe P. A., Ritchie W. A., Carlisle A., Ellard F. M., Pena R. N., Rowe J., Clark A. J., King T. J. and Mitrophanous K. A. (2004) Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. *FEBS Lett* 571, 233-6.
- 15 Yoshida M., Kobayashi K., Kuo T. T., Bry L., Glickman J. N., Claypool S. M., Kaser A., Nagaishi T., Higgins D. E., Mizoguchi E., Wakatsuki Y., Roopenian D. C., Mizoguchi A., Lencer W. I. and Blumberg R. S. (2006) Neonatal Fc preceptor for IgG regulates mucosal immune responses to luminal bacteria. *J Clin Invest* 116, 2142-2151.
- Zhao Y., Kacs Kovics I., Zhao Z. and Hammarstrom L. (2003) Presence of the di-leucine motif in the cytoplasmic tail of the pig FcRn alpha chain. *Vet Immunol Immunopathol* 96, 229-33.
- 20 Zhu X., Meng G., Dickinson B. L., Li X., Mizoguchi E., Miao L., Wang Y., Robert C., Wu B., Smith P. D., Lencer W.I. and Blumberg R. S. (2001) MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells. *J Immunol* 166, 3266-76.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY CENTER EOTVOS LORAND UNIVERSITY
- 25 <120> ANIMAL TRANSGÉNICO CON RESPUESTA INMUNE POTENCIADA Y MÉTODO PARA LA PREPARACIÓN DEL MISMO
- <130> 103608/LT
- <160> 58
- <170> Patentl version 3.3
- 30 <210> 1
- <211> 22
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 35 <220>
- <223> Cebador sintético PCR específico de ARNm de cadena-alfa de bFcRn
- <400> 1
- cagtaccact tcaccgccgt gt 22
- 40 <210> 2
- <211> 22
- <212> ADN
- <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador sintético PCR específico de ARNm de cadena-alfa de bFcRn
 <400> 2
 5 cttggagcgc ttcgaggaag ag 22
 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Cebador sintético PCR específico de bFcRn
 <400> 3
 cggccacctc taccacattt 20
 15 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Cebador sintético PCR específico de bFcRn
 <400> 4
 tgcattgacc acacttggtt 20
 <210> 5
 25 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Cebador sintético PCR específico de pBAC, U80929 11380-11404
 <400> 5
 acctctttct ccgcaccoga catag 25
 <210> 6
 <211> 25
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

<223> Cebador sintético PCR específico de bFcRn
 <400> 6
 gttcaagtcc aaaggcaggc tatct 25
 <210> 7
 5 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> Cebador sintético PCR específico de bFcRn
 <400> 7
 cctttacca caccactcc ccaca 25
 <210> 8
 <211> 25
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador sintético PCR específico de pBAC, U80929, 3801-3777
 20 <400> 8
 agaagttcgt gccgccgccg tagta 25
 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador sintético PCR específico de bFcRn
 <400> 9
 30 ctccttgtc ttgggcactt 20
 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

35
 <220>
 <223> Cebador sintético PCR específico de bFcRn

<400> 10
 gccgcggatc ccttcctct g 21
 <210> 11
 <211> 25
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético PCR específico de bFcRn
 10 <400> 11
 aaagtttctc gagagaggca gagac 25
 <210> 12
 <211> 25
 <212> ADN
 15 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético PCR específico de bFcRn
 <400> 12
 20 tagttacaga gcctggatag gctga 25
 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador sintético PCR específico de BAC 128EOH extremo 5'
 <400> 13
 tttagctgca tcgggatctt 20
 30 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 35 <220>
 <223> Cebador sintético PCR específico de BAC 128EOH extremo 5'
 <400> 14

	ggagtgatgg catttggtt	20
	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético PCR específico de FLT3LG	
	<400> 15	
10	tcggagatgg agaaactgct	20
	<210> 16	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador sintético PCR específico de FLT3LG	
	<400> 16	
	ctggacgaag cgaagacag	19
20	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador sintético PCR específico de LOC539196	
	<400> 17	
	agaacgtgcg taccaaaagc	20
	<210> 18	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador sintético PCR específico de LOC539196	
	<400> 18	
	agcggttgta ctttcgatg	20

	<210> 19	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador sintético PCR específico de bFCGRT	
	<400> 19	
	ccaagtttgc cctgaacg	18
	<210> 20	
10	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador sintético PCR específico de bFCGRT	
	<400> 20	
	gtgtgggcag gagtagagga	20
	<210> 21	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético PCR específico de LOC522073	
25	<400> 21	
	agtggctcctg ggattgacag	20
	<210> 22	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético PCR específico de LOC522073	
	<400> 22	
35	tcactgagtc ccgtatgtgc	20
	<210> 23	
	<211> 18	

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Cebador sintético PCR específico de LOC511234

<400> 23

ctacgtgtgc gccgtgac 18

<210> 24

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador sintético PCR específico de LOC511234

15 <400> 24

aatcagcttc tccacgcact 20

<210> 25

<211> 20

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador sintético PCR específico de LOC511235

<400> 25

25 gttgttcaca ccaggaacc 20

<210> 26

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

30

<220>

<223> Cebador sintético PCR específico de LOC511235

<400> 26

cctttgccat ttagatgta gc 22

35 <210> 27

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador sintético PCR específico de BAC128EOH extremo-3'

5 <400> 27

agtcgtgtcc gactcttgc 20

<210> 28

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador sintético PCR específico de BAC128EOH extremo-3'

<400> 28

15 cagcctgtct ggtgttctga 20

<210> 29

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Cebador sintético PCR específico de beta-actina de ratón

<400> 29

tggctttctg aacttgacaa cattat 26

<210> 30

25 <211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> Cebador sintético PCR específico de beta-actina de ratón

<400> 30

ttcacctgcc ctgagtgtt c 21

<210> 31

<211> 26

35 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador sintético PCR específico de beta-actina de ratón
 <400> 31
 tgaaggtctc aaacatgac tgtaga 26

5 <210> 32
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

10 <223> Cebador sintético PCR específico de bFCGRT
 <400> 32
 cacagtcaag agtggcgacg agcac 25
 <210> 33
 <211> 18

15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético PCR específico de bFCGRT

20 <400> 33
 gcaccacgca gcggtagt 18
 <210> 34
 <211> 21
 <212> ADN

25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético PCR específico de bFCGRT

30 <400> 34
 ccttctacgc ctggtcatca c 21
 <210> 35
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Cebador sintético PCR específico de bFCGRT

<400> 35
 ggcgacgagc accactac 18
 <210> 36
 <211> 19
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético PCR específico de bFCGRT
 10 <400> 36
 gattcccgga ggctwcaca 19
 <210> 37
 <211> 22
 <212> ADN
 15 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético PCR específico de ARNm de cadena-alfa de bFcRn
 <400> 37
 20 cgcagcarta yctgasctac aa 22
 <210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador sintético PCR específico de ARNm de cadena-alfa de bFcRn
 <400> 38
 ggctccttc actccaggtt 20
 30 <210> 39
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

 35 <220>
 <223> Cebador sintético PCR específico del promotor de bFcRn
 <400> 39

gggtctagaa caccaagggc ggcatca 27

<210> 40

<211> 29

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador sintético PCR específico del promotor de bFcRn

<400> 40

10 ggggaattcc ggctcccggtg actggagac 29

<210> 41

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Cebador sintético PCR específico de bFcRn

<400> 41

ggggaattct ggggccgcag agggaagg 28

20 <210> 42

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> Cebador sintético PCR específico de bFcRn

<400> 42

gggacgcgtg aggcagatca caggaggaga aat 33

<210> 43

30 <211> 4235

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35 <223> Constructo P2-bFcRn que codifica un segmento de 2950 pb del promotor de cadena pesada de bFcRn y un segmento de 1285 pb del ADNc de cadena pesada de bFcRn

<400> 43

ES 2 368 622 T3

ctagaacacc aagggcggca tcatgagtga gctccctgtg ctgttggtcc aaaggcacct	60
tggttcgttt tgaagttgga actaagcgcc catattttca tttcccactg ggctctgcac	120
atttcataac tgtcctgctg ttttctatta ctttatcagg ggcccctggc gatgtgatag	180
taggacccca cggaatctaa aaggtatagg caaagggact tccctggtgg tccagtgggt	240
aggactcggg gcttttactg ctggggccca aggttcaatc cctgatcagg gaaactaaga	300
tcctgcaagc tgcattggcac accctgcaaa tgccacccca ccccccaaa aaaaacatgc	360
atgagccggg atcattagag catatgagac aggcagcaga tgctgtaaat ggtccctgaa	420
gacacagaag gttccacgac acttagcagc gattcctggg gggattaaag ggaacttgag	480
agctttttct tttgaagcaa ggaggaggaa cattatgagg aatgttcagg tcagacctct	540
gagaggcctc atggctaaac cccgaggtca ttctgacagg aggaaaggaa gacctgaatg	600
gggactctac agcagagcca agggagggca ccctccatga ctgtgaccat gctagactgg	660
atagtgttcc ccaaagctgc ctgtgcccta gagctccaaa gcctgtgatt acatgacctt	720
gtttaataaaa gggaactttg aagatgtgat taaattcagg atcttgtgat ggggagatga	780

ES 2 368 622 T3

tcttgatta tccaggtggg accaatgtca tcacaagcgt ccttagaaga gggaaggtca	840
gcaagttcct gagaaatgtg gaaagtttct tgcctgggtc gccagcaatg caggagacag	900
caacaggagc tgtgggtttg atccctgggt aggggaagatc ccctggaaga ggaaatggca	960
accactcca gcattcttga ctggcagaag cccatggaca gaggaggctg atgggctacc	1020
gtgcacgggg ttgcaaagag tcggacacaa ctaagcacac acaagtacat ggtaaagac	1080
gtgtcgactt ggcggggcca cagtgcctgg atgtttggc caacattatt ctggatgttt	1140
ctgtgtgggt gtttgggggt gaaattacac tgaaatcagt ggactctgag tagagccgac	1200
cacccccac cataatgtgg gtgggcctca tccaatcagt cgaagggtga agactgacct	1260
tccctcaagc aaaggggaac cctgccagcg gactgcgttt agatttcac tgcaagatga	1320
gctcttctgg gttttccaga tagcctgcct ttggacttga actgtaattc tttccggcca	1380
cctctatcac attttgaact cgccaagtct tcacgatcac gtgcgtcaat ttcttacct	1440
aagtctcttt ctctctatat atacacatcc tgttgattct gtttttcaa gaaacctga	1500
ctaatatatc atatgacct gcaagtccac tcctggagaa ggcaatggca ccctactcca	1560
gtactcttgc ctggcaaatc ccatggacgg aggagcctgg taggctgcag tccatgggg	1620
cgctgagggt cggacacgac tgagtgactt ccctttcact tttcacttcc atgcattgga	1680
gaaggaaatg gcaaccacct ccagtgttct tgcctggaga atcccaggga ctggggagcc	1740
tggtgggctg ccatctgtgg ggttgacac agtcggacac gactgaagtg gtttagcagc	1800
agcagcagca catgcaggga aaaaaaatgt aaaaaaaca caacaacctt gcaagaaaat	1860
atgtgcagca gcattagtca taatagccaa aaaagtgaac acaaccaa atgtccatcagc	1920
tgctaaagg atgaaccaag tgtggtcaat gcatacgacg gactatcacc cagccgtgaa	1980
gaggaacgaa gtcctgccgc atgctaccat gtggctaaat cttgaaaacg gcattgctgg	2040
aaattccctg gcaaaccagt ggtaagact ctgcatttcc attgtgatct tctgcaagtc	2100
ctgcggggag gccaaaaaaa gaaaaacccc accgtacact aaatgaaaga tgccagatat	2160
aaaatgccac attaatgtga aatgtcctga attggcaaat ccatgggtgac agaaagtaaa	2220
tttgtggttg caggggcagg ggggagaagg gaccacttaa tgtgtctggg atctcctttg	2280
ggatgatgaa aaagtctctg aactagatcg tggatggtg tgcacaacat tgtgagtgc	2340
ccaaatgtca ctaatagtaa ctctttgtc ttgggcactt tacccaataa aacaagtga	2400
tggaagcgtt atagcaggaa tgtgggctgg aagtgggagg ctggatgatg tcccaagtat	2460
ggtgtagaat attgggtctg tgcattactg aggtcatacc agaagatata aaggaattgc	2520
aggggcactt taagagggcc ccttgccgga ggaaggaga aatgtggaag ctggaggact	2580

ES 2 368 622 T3

```

tttatcaccg caggcgtag tgacctttc ggatggggg cagacaagga ggtaaggagg 2640
ggaccacac agacctcaa atttggcact cggataatac tgattctcaa ctttgtcatg 2700
aatttgctgg gtggctgaca ttctcaagat aagaaaatca gggagcacca gtgcaagaga 2760
gagaaaaaaa aaaaaaaaaaag caaaaagttt ctcgagagag gcagagacgg aactcagcc 2820
agaccgggccc ctgggcccgg ggtgtgccct acagctgtag gggcgggggt ggatattcct 2880
ggagtgaag agccgtcgtc tctggacagg atgtgagaga ggaactgggg tctccagtca 2940
cgggagccgg aattctgggg ccgcagaggg aagggatcgc ggctgccagt gagtctccca 3000
ctcaggatgc ggcttccccg gcctcagccc tgggggctcg gtctgtctgt cgtcctcctg 3060
cctggggcgc tgagcgcaga gaactatcgc tcgctccagt accacttcac cgccgtgtcg 3120
gccccgcag cggggacccc tgctttctgg gtttcgggct ggctggggcc ccagcagtac 3180
ctgagctaca ataatctacg ggcgcaggct gagccctacg gcgcgtgggt ctgggaaagc 3240
caggtgtcct ggtattggga gaaagagacc atggatctga ggaaccagga gacgctcttc 3300
ctcgaagcgc tccaagcttt aggcgaaggc cccttcacca tgcagggcct gttgggctgc 3360
gagttggggc ctgacaatgt ctcgggtgccg gtggccaagt ttgccctgaa cggcgaggag 3420
ttcatgatgt ttgaccccaa gctgggcac tgggatggtg actggcctga gtcccgact 3480
gtcagtatca agtgagcga gcagccagag gcggtcaaca aggagaagac cttcctcctc 3540
tactcctgcc cacaccggct gctggggcat ctggagaggg gccggggcaa cctggagtgg 3600
aaagagccac cctccatgcg cctgaaggcc cggcccggca gtcccggctt ctctgtgctc 3660
acctgcagcg ctttctcctt ctaccacct gagctgaagc tgcgctttct gcggaacggg 3720
ctggccattg gctctggtga gatagacatg ggccccaacg gcgacggctc cttctacgcc 3780
tggtcatcac tcacagtcaa gagtggcgac gagcaccact accgctgcgt ggtgcagcac 3840
gcggggctgg ccagcccct cacgggtggag ctggaatcac cagccaggac ctcggtgcca 3900
gtggtgggga tcgtcatcgg cttattcctg ctcctgacag tggctgcggg aggagctctc 3960
ctgtggagaa ggatgaggaa ggggctgcca gtccttggga tctctttccg tggggaggat 4020
gtagggggccc tcctgcccac tcccggcctg tccaaggatg gtgaatctta ggataaaaat 4080
gcattcccag caactgccga tcatcccca tcctggctgt taccagctaa tgcctcagg 4140
tccttttcat gctgtgagac ctccgggaat cctggtatct ttgagcctcc ggaaggagcc 4200
cgatgtcctc cctctggatt tctcctcctg tgatc 4235

```

<210> 44

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador sintético PCR específico del exón 4 de bFcRn

	<400> 44	
	gaggcagatc acaggaggag	20
	<210> 45	
	<211> 19	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético PCR específico de NEO	
10	<400> 45	
	ggaattccca gtgaagggc	19
	<210> 46	
	<211> 25	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador sintético PCR específico de NEO	
	<400> 46	
20	cgagcctgag attgtcaagt gtatt	25
	<210> 47	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador sintético PCR específico de FcRn	
	<400> 47	
	gggatgccac tgccctg	17
30	<210> 48	
	<211> 1645	
	<212> ADN	
	<213> Oryctolagus cuniculus	
35	<400> 48	

ES 2 368 622 T3

```

ggggtctgca gtcacgggag caggtccggg ctgcggcgct ggggtggccg gccccgctcg      60
ggagaggccc cgccgcccgg tcactcatta acccggccgc tcccgcccg gggcgaaagt      120
tcacgcagtg gccggcgcg cggcctccgc agctccagcc ccggacccca ggcgcggggc      180
cccggggagg ggcggggcg ggtccgacag tcacgcgcc ctcccgcgcc agctcggcca      240
cgcagcatgg ggcgcccccg gcttctgccc ggcgcgctgc gcctcctget ctgcctgctt      300
cccgggaccc tgggtgcagg gagccatctc tccctcctgt accacatcac ggccgtgacc      360
gacccccatg gggggactcc ctccctcttt gtgtccggtt ggctgggccc ccagcagtac      420
ctgagctaca gcaacaggcg gtcggaggcg gagccctatg gggcttggat ctgggaaagc      480
caggtgtcct ggtactggga gaaagagacc gtggacctga agaacaaaca gcagctcttt      540
ctggaagctc tcgaagtgtt gggggaaggt tcctacaccc tgcagggcct gctgggctgt      600
gagctgggccc cagacaacgc ctccgtgccc acagccaagt tcgccctgaa cggtgaggac      660
ttcatgagtt tcgaccccaa gcagggcagc tgggctgggg agtgggccga ggccctgcgg      720
atcagcacca ggtggcagca gcaggccgag gcggtcagca aggagagaac cttcctgctc      780

acctcctgcc ccagcggtt gctggggcac ctggagaggg gccgcggcaa cctggagtgg      840
aaggagccgc cctccatgcg cctgaaggcc cggcccggct ctcccggctt ctccgtgctc      900
acctgcagcg ctttctcctt ctaccgccc gagctgcagt tcggattcct ccggaatggg      960
atggcggccc gctccggaga gggcggttc ggcccaacg gcgacggctc cttctacgcc     1020
tgggcttcgc tgtccgtgcg cagcggcgac gaggaccgct acagctgcgt ggtgcgccac     1080
gcggggctgc cgcagccgct gtcgggtggc ctggattggc cagcccagtc ctccgtgacc     1140
gtggcgggca tcgttgctcg cgtcctgctg ctggtggccg tggccgcggg agtcccctg      1200
gcgtggagga ggaggaggg gctgccagcc ccctgggtct ttctccgtgg ggacgacatc      1260
agaacgctcc tgcccaaga cgagggcccc caggacgtga gcgccttccc ggccactgcc      1320
tgacgccttg ttccggctgc tggtcgccgg ccgaggcagc cagctctctc gtgctgtgag      1380
acctctggaa tcccggcctc tctgagcctc caggagtcct ggaccctgct cccagggcct      1440
gcctgcgcgc ccccacgtcc acaccgctg taaccctgtt gggcccccct cctcttgctt      1500
gtgctccagt tggggggcg ggggaggcc agggagtggg gtggggggcg aagcccgggg      1560
ctcctggctc tgccgtctaa catgtacca cttttgtatt ccaaggcatg tatttccac      1620
tcacaaatat ttacgtaata cttttt      1645

```

<210> 49

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>
 <223> Cebador sintético PCR específico de rFcRn
 <400> 49
 gggactccct ccttcttgt 20
 5 <210> 50
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador sintético PCR específico de rFcRn
 <400> 50
 agcacttcga gagcttcag 20
 <210> 51
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 20 <223> Cebador sintético PCR específico de RCN3
 <400> 51
 gacgccgaga cctacaagaa 20
 <210> 52
 <211> 18
 25 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador sintético PCR específico de RCN3
 30 <400> 52
 catgtgcggg aactcctc 18
 <210> 53
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador sintético PCR específico de FCGRT
 <400> 53
 ctgaacgggtg aggacttcat 20
 <210> 54
 5 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> Cebador sintético PCR específico de FCGRT
 <400> 54
 gctcctcca ctccagggt 19
 <210> 55
 <211> 18
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador sintético PCR específico de RPS11
 20 <400> 55
 agatcggcga catcgtca 18
 <210> 56
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador sintético PCR específico de RPS11
 <400> 56
 30 tctggaactg cttcttggtg 20
 <210> 57
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

35
 <220>
 <223> Cebador sintético PCR específico de RPL13A

<400> 57

catgaggtgg gctggaagta

20

<210> 58

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Cebador sintético PCR específico de RPL13A

<400> 58

tccggtagtg gatcttagcc

20

REIVINDICACIONES

1. Método no terapéutico para desarrollar una respuesta inmune humoral potenciada, comprendiendo el método la etapa de poner en contacto un animal transgénico (Tg) no humano con un antígeno de interés, comprendiendo el animal Tg no humano un constructo genético, caracterizado porque dicho constructo genético prevé la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena- α de la proteína de FcRn, y caracterizado porque dicha secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena- α de la proteína de FcRn se sobreexpresa, previendo así el constructo genético la protección potenciada de la IgG contra la degradación así como la respuesta inmune humoral potenciada contra dicho antígeno en comparación con un animal de control no transgénico de la misma especie.
- 5 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho constructo genético prevé la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena- α bovina de la proteína de FcRn o codifica para una cadena- α que tiene una identidad de secuencia de aproximadamente el 60% ~~así~~ con la secuencia de la proteína de FcRn bovino.
- 10

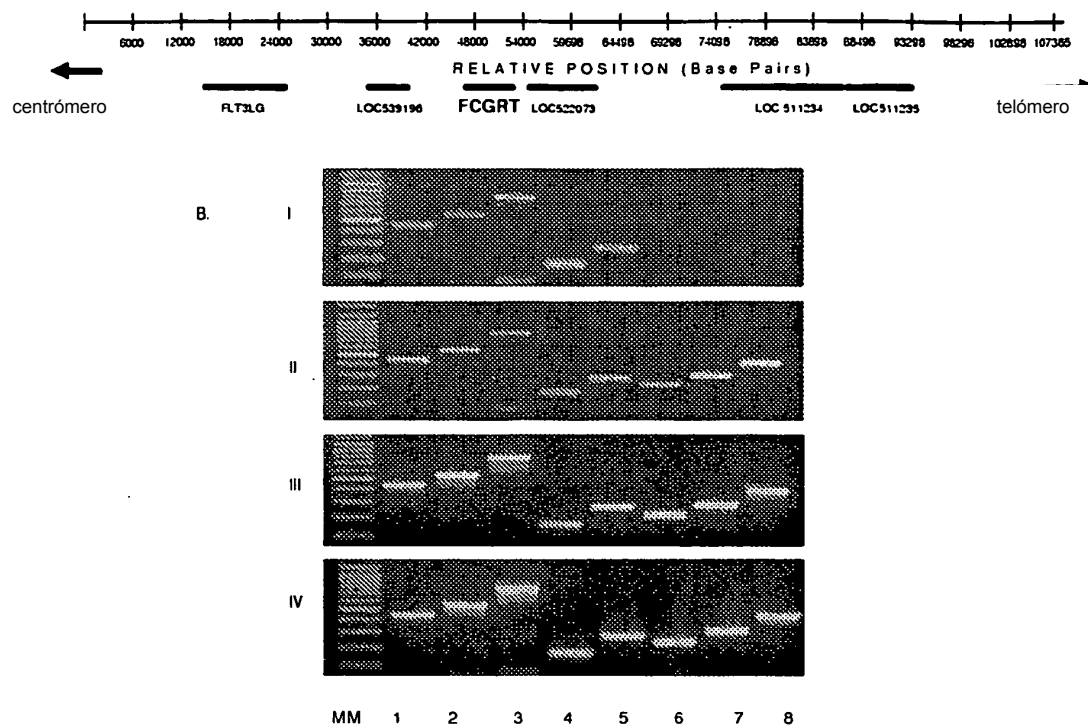


Fig. 1

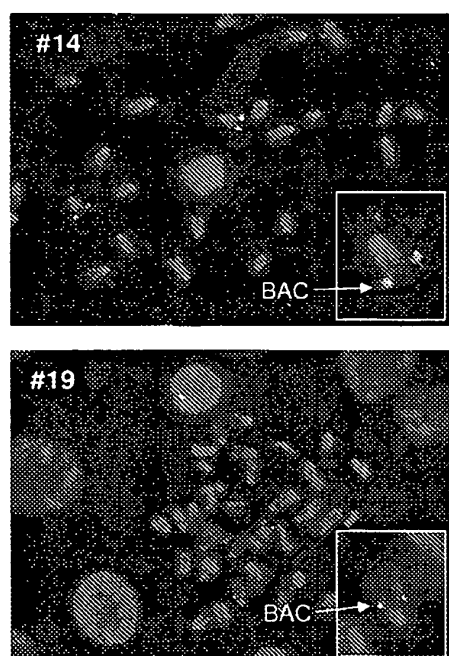


Fig. 2

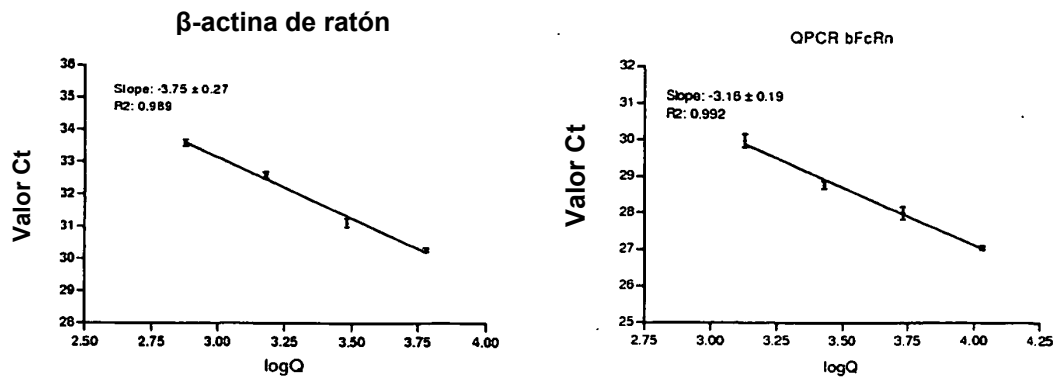


Figura 3

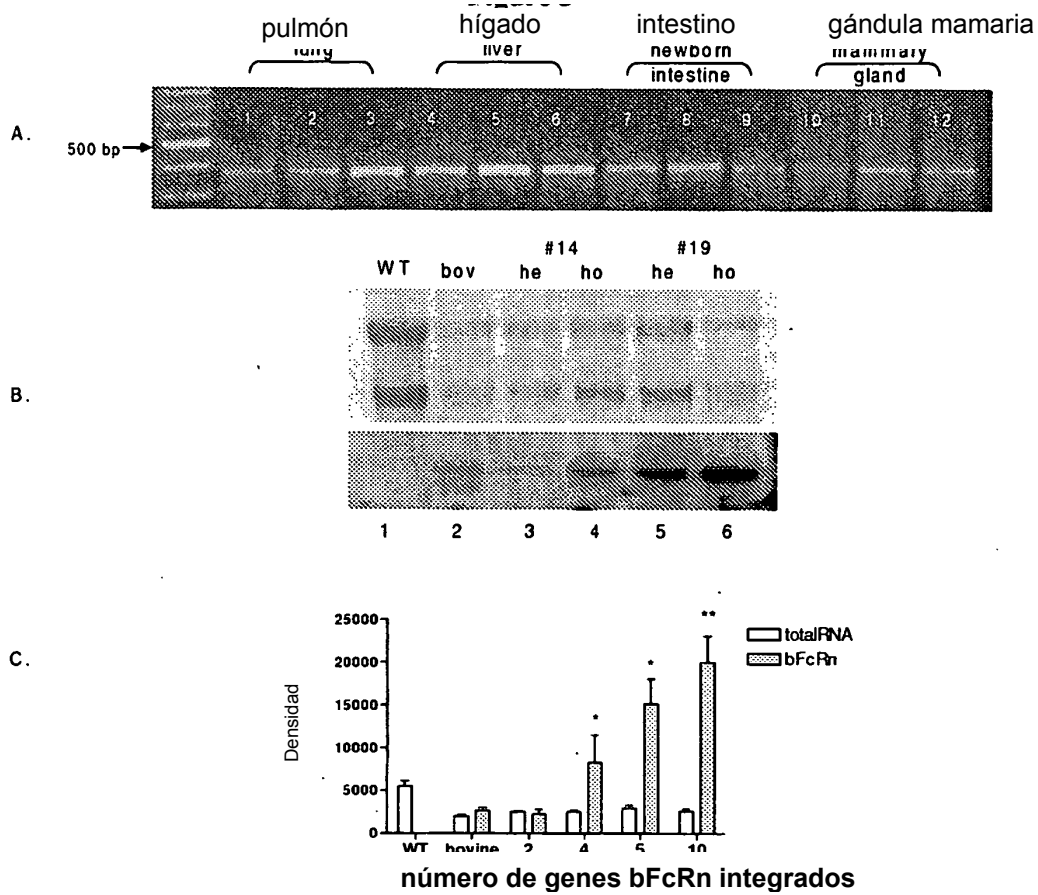


Figura 4

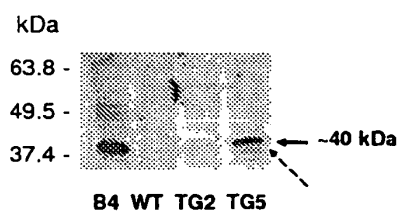


Figura 5

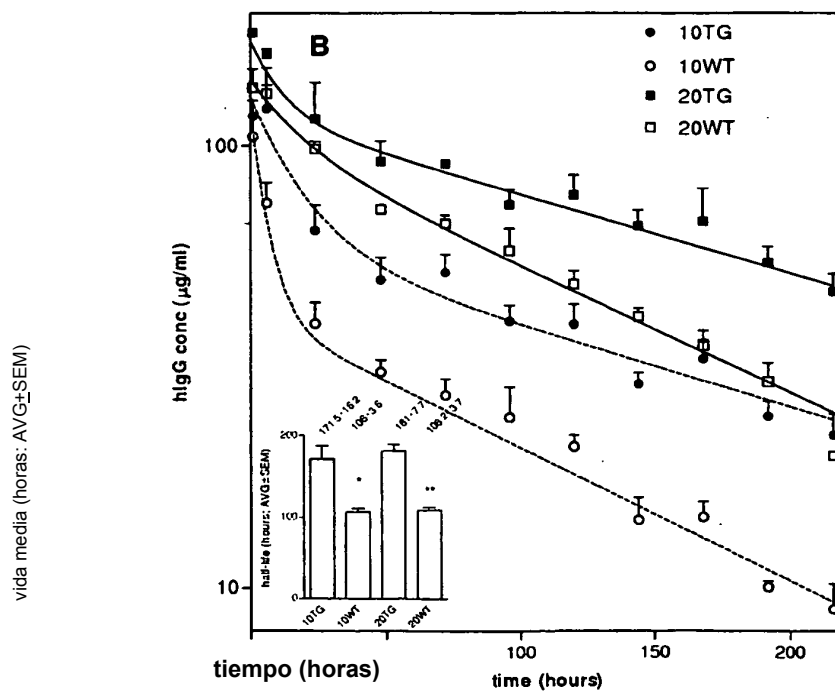
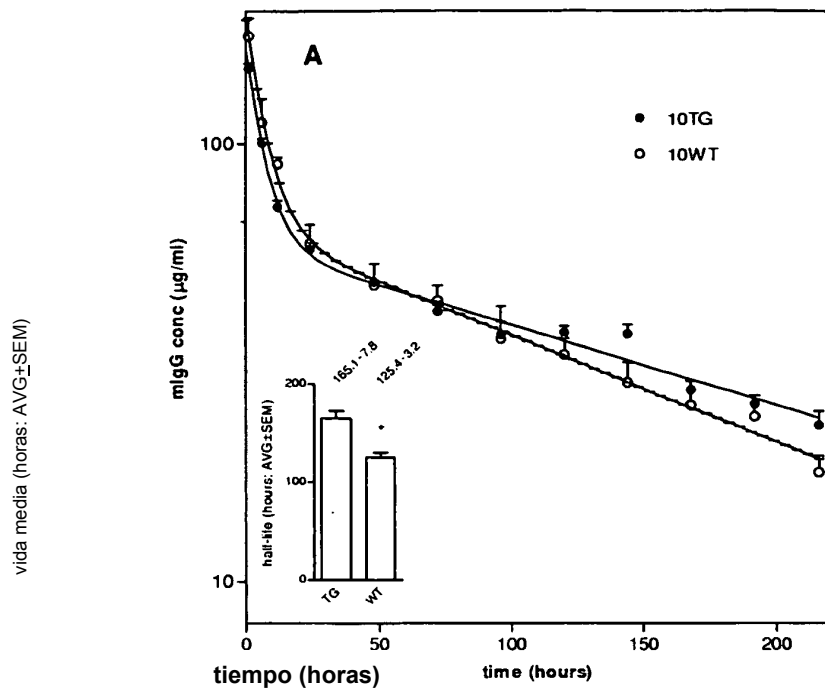


Figura 6

Figure 6

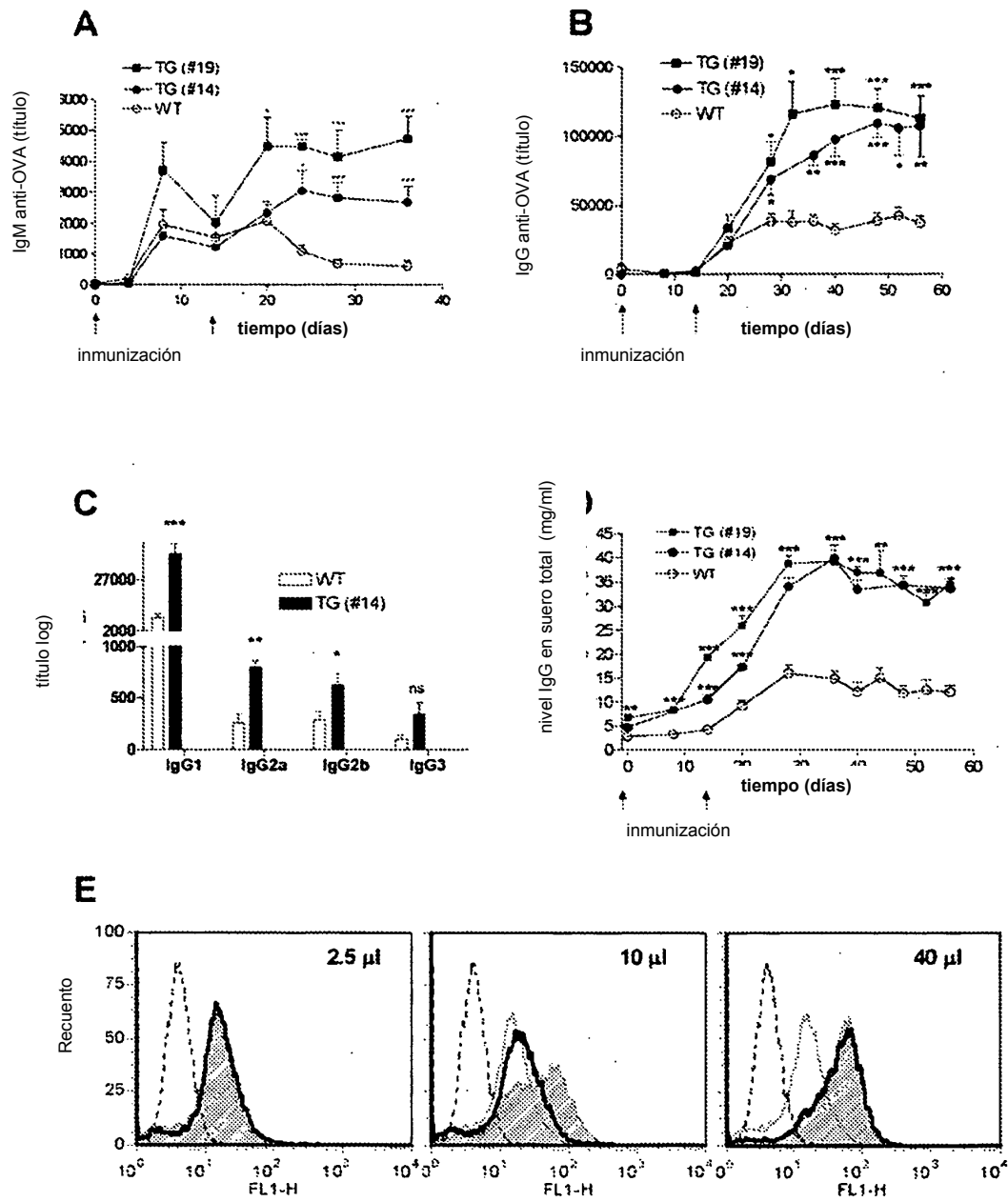


Figura 7

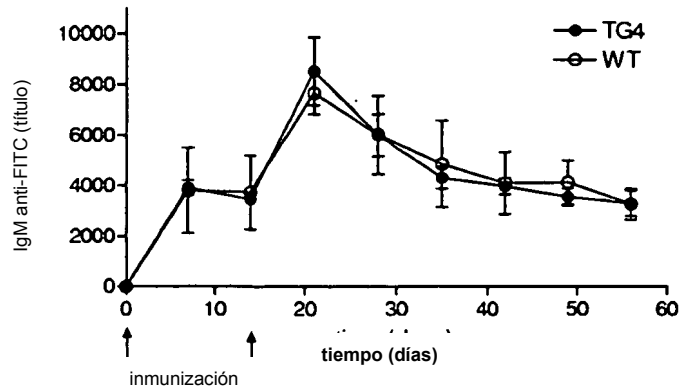


Fig. 8.

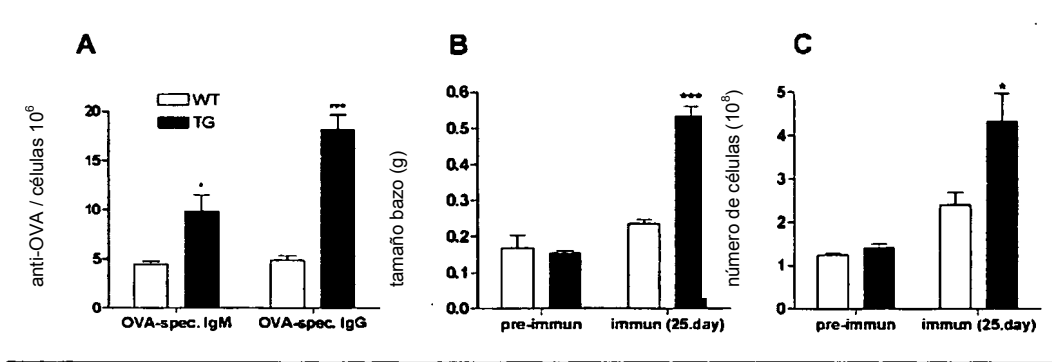


Fig. 9.

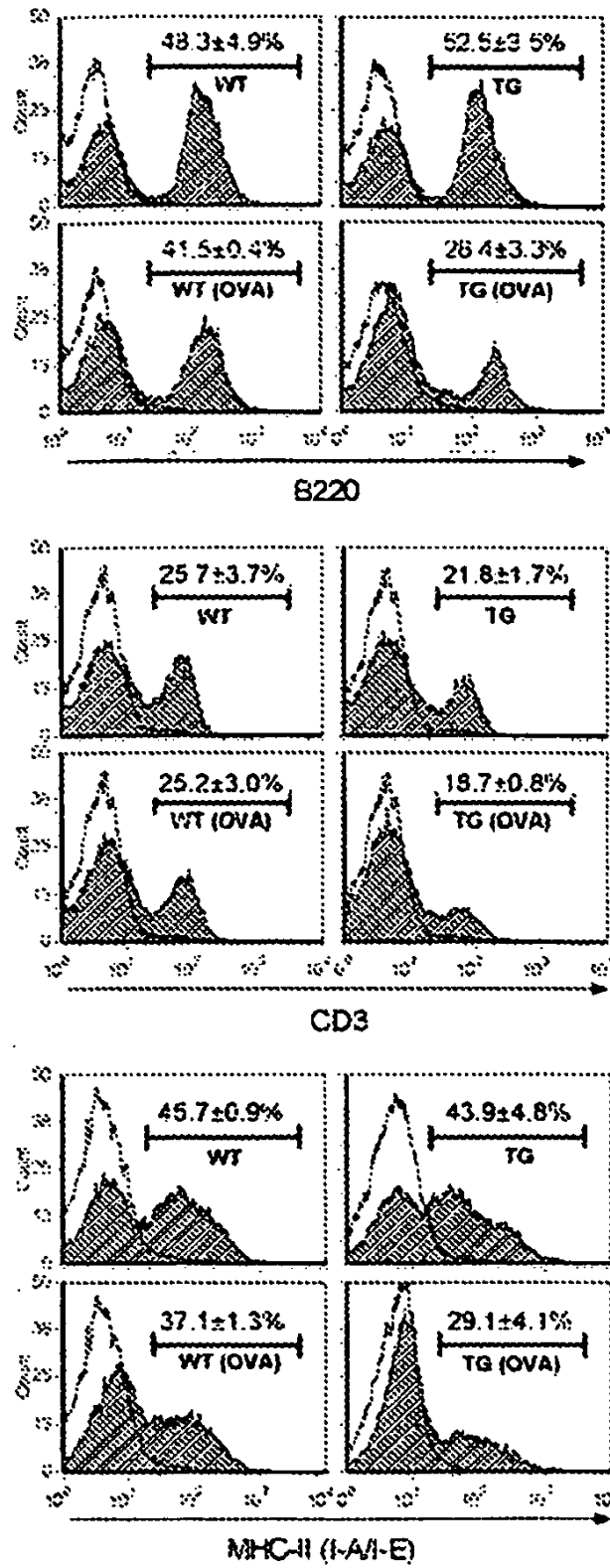


Fig. 10.

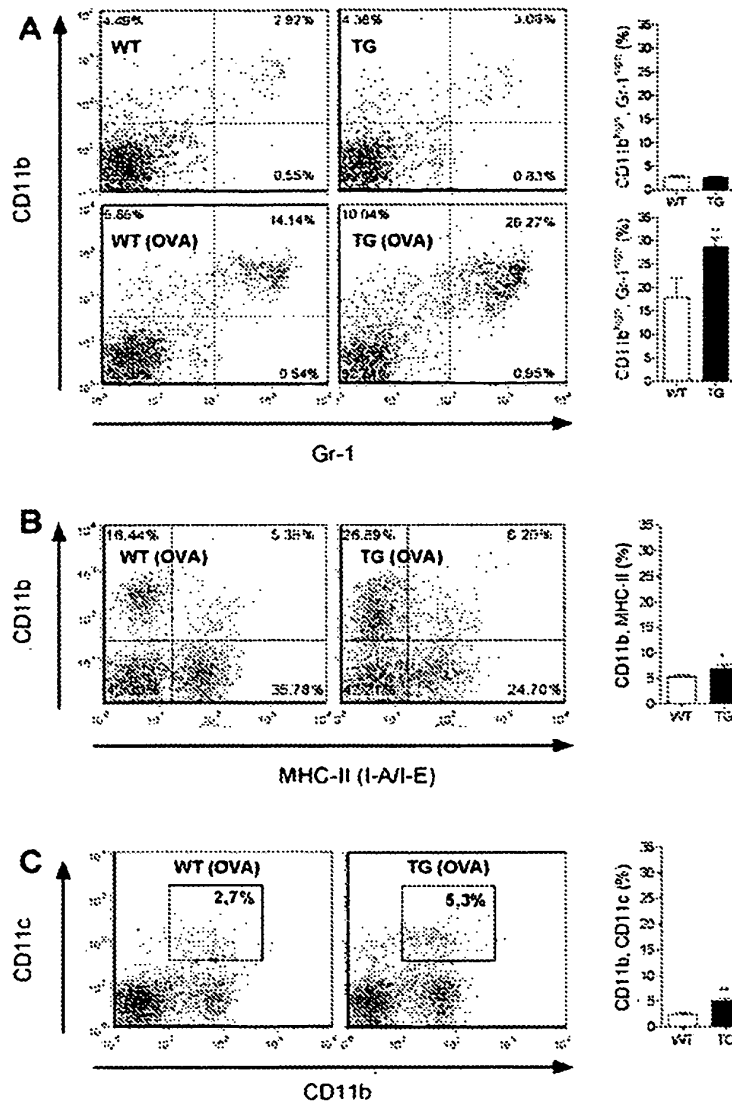


Fig. 11.

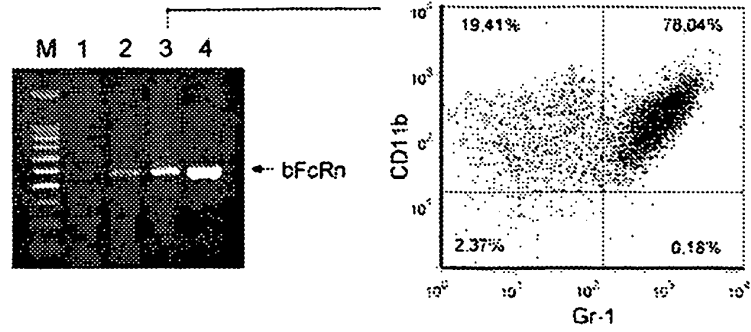


Fig. 12.

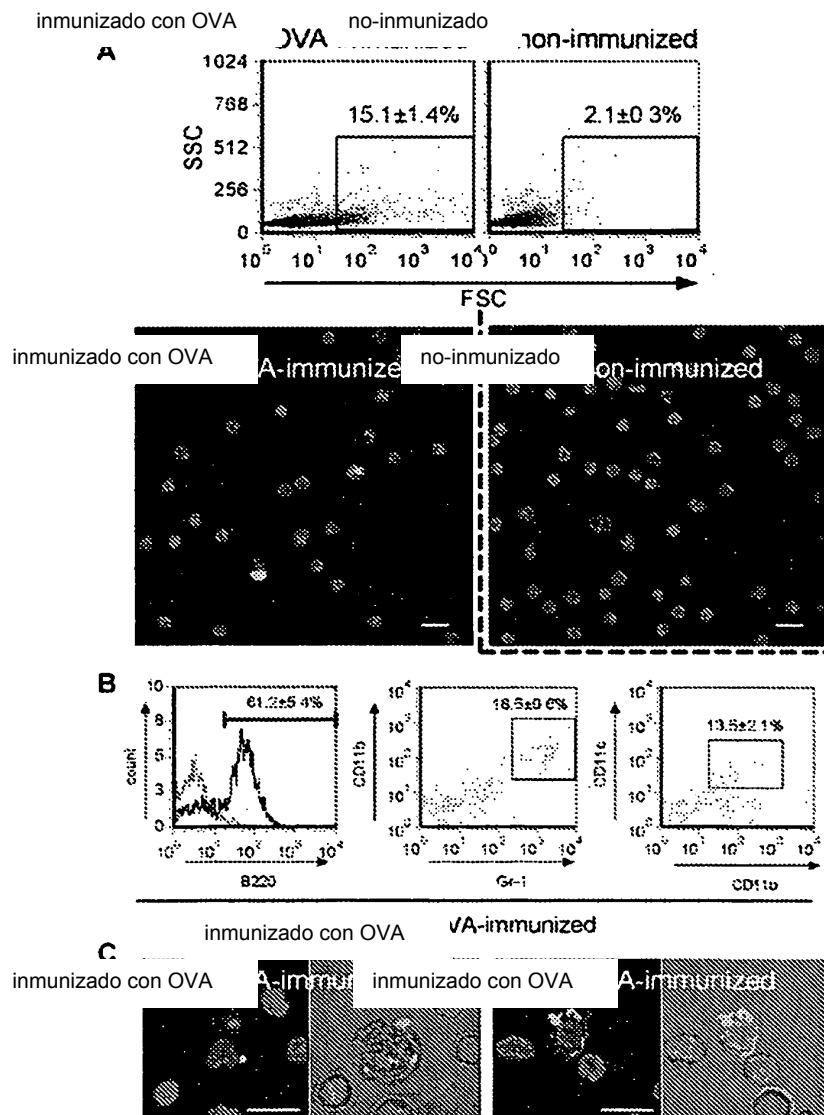


Fig. 13.

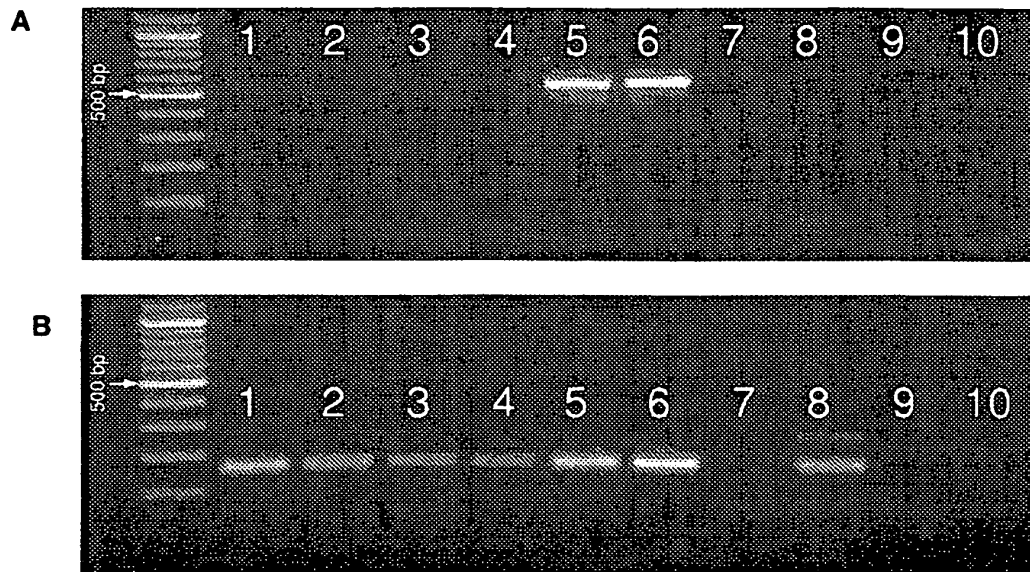


Fig. 14

conc. albúmina en suero wt_KO_tg4_tg10
serum albumin conc KO wt tg4 tg10

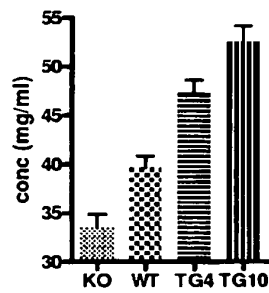


Fig. 15

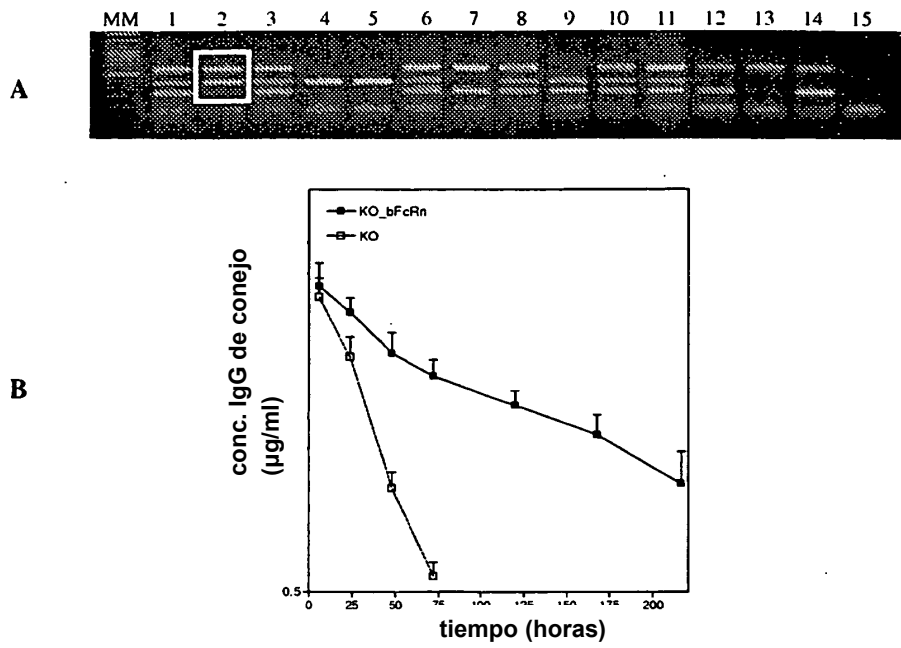


Fig. 16

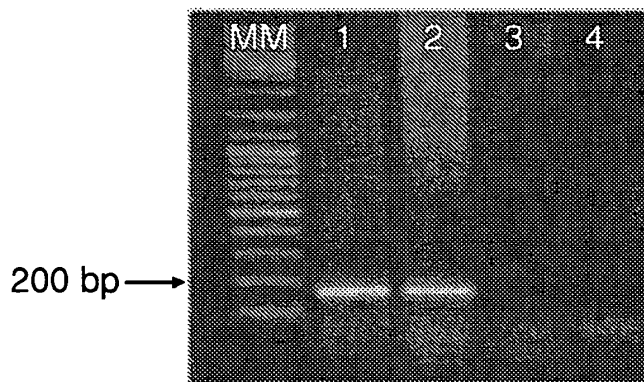


Fig. 17

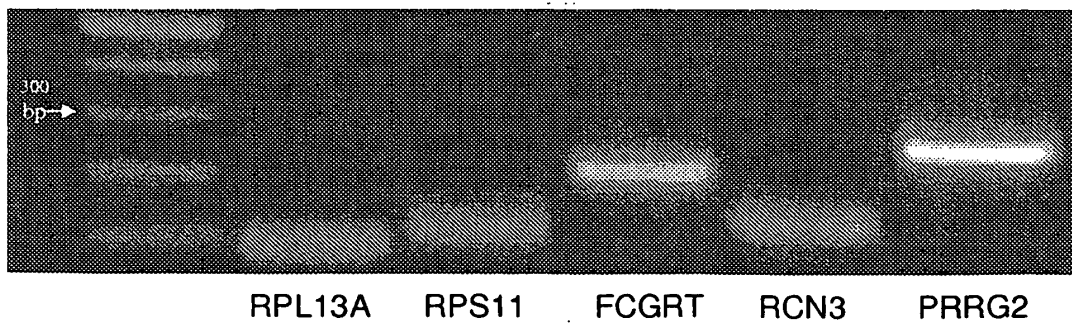


Fig. 18