

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 804**

51 Int. Cl.:  
**A01K 67/027** (2006.01)  
**C12N 15/09** (2006.01)  
**C12P 21/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04820979 .5**  
96 Fecha de presentación: **05.11.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1712126**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.2006**

54 Título: **Método de construcción de un ave transgénica**

30 Prioridad:  
**08.01.2004 JP 2004003045**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.05.2012**

73 Titular/es:  
**KANEKA CORPORATION**  
**2-4, Nakanoshima 3-chome Kita-ku**  
**Osaka-shi, Osaka 530-8288, JP y**  
**NAGOYA UNIVERSITY**

72 Inventor/es:  
**YAMASHITA, Takashi;**  
**SHINDO, Takuya;**  
**IJIMA, Shinji;**  
**KAMIHIRA, Masamichi y**  
**NISHIJIMA, Kenichi**

74 Agente/Representante:  
**García-Cabrerizo y del Santo, Pedro**

ES 2 380 804 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método de construcción de un ave transgénica.

### CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a un método para construir un ave transgénica que es aplicable en la producción de una proteína fisiológicamente activa.

### TÉCNICA ANTECEDENTE

10 Como resultado de los progresos en la tecnología de recombinación génica, un gran número de proteínas fisiológicamente activas se han producido a nivel comercial para su uso como fármacos y en otros usos. Sin embargo, microorganismos como *Escherichia coli* que se han usado de la forma más frecuente en la producción de dichas proteínas recombinantes son incapaces de añadirles una cadena glucídica y, por lo tanto, las proteínas producidas no pueden experimentar modificación mediante la adición de cadena glucídica; por lo tanto, de forma desfavorable, muestran descensos de actividad en comparación con su actividad intrínseca y/o muestran deterioros de estabilidad.

15 Además, los microorganismos no pueden producir proteínas complicadas compuestas por una pluralidad de unidades, por ejemplo anticuerpos. Es una gran desventaja que no pueden utilizarse para producir anticuerpos monoclonales que se usarán como fármacos.

20 Por lo tanto, aquellas proteínas fisiológicamente activas tales como eritropoyetina y anticuerpos usados como fármacos, que se requiere que tengan una cadena glucídica, se producen actualmente por medio de reactores de células cultivadas. Sin embargo, dichos procesos de producción que usan células animales conllevan mayores costes en comparación con el uso de microorganismos y, por lo tanto, es un problema que se impone una gran carga a los pacientes y a la administración.

25 Un nuevo método para producir proteínas mientras se superan estas desventajas que ha llamado la atención comprende la utilización de animales transgénicos. Las proteínas producidas en leche, sangre o huevos por animales transgénicos pueden tener una cadena o cadenas glucídicas añadidas y, además, el coste de producción es de un décimo a un centésimo en comparación con el caso del uso de células animales cultivadas (Nature Biotechnology 19, 184, 2001). Se espera que la transgénica que usa aves, por ejemplo, se lleve a la práctica debido a características ventajosas tales como la brevedad del periodo hasta la madurez y la pequeñez del área de cría.

30 Aunque la tecnología de producción de proteínas que utiliza aves transgénicas tiene estas y otras ventajas, se han encontrado algunas dificultades para llevar esa tecnología a uso práctico. Una de ellas es la dificultad para introducir un gen extraño en huevos de ave fertilizados (Harvey A. J. et al. Consistent production of transgenic chickens using replication-deficient retroviral vectors and high-throughput screening procedures. Poultry Sci., Feb. 2002, Vol. 81, No. 2, págs. 202-212). Los inventores de la presente invención tuvieron éxito anteriormente en la construcción de forma eficaz de quimeras transgénicas (denominadas como "G0") que portan un transgén parcialmente en sus cuerpos como resultado de microinyección del gen en embriones tempranos de ave usando un vector viral de replicación deficiente altamente seguro (Publicación "Kokai" de Solicitud de Patente Japonesa 2002-176880).

35 Sin embargo, el gen introducido de esta manera experimenta inactivación mediante los mecanismos biofilácticos del huésped (fenómeno llamado silenciamiento), no consiguiendo producir la proteína deseada o produciendo la proteína, si ésta se expresa, solamente en cantidades vestigiales. Además, para suministrar la proteína de forma estable como una medicina, es necesario establecer una línea aviar que tiene un transgén en todas las células somáticas del cuerpo como descendencia de la quimera transgénica G0. Esta descendencia de la quimera transgénica G0 se denominan G1, G2, G3 y similares en el orden de generación.

### RESUMEN DE LA INVENCION

45 En vista del estado de la técnica mencionado anteriormente, es un objeto de la presente invención establecer un método eficaz para construir aves transgénicas que tienen un transgén en todas las células somáticas y capaces de expresar la proteína codificada por el transgén a niveles altos con el fin de aplicar las aves transgénicas como un sistema seguro y eficaz de producción de proteínas.

La invención es un método como se especifica en la reivindicación 1.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

50 La invención es un método como se especifica en la reivindicación 1. Cuando se inyecta el vector en el corazón formado de forma temprana en el embrión después del paso de cierto periodo de tiempo especificable dependiendo de las especies aviares, el embrión temprano objetivo de la inyección puede dar un ave transgénica capaz de expresar eficazmente el gen en cuestión.

El gen que se introducirá en un ave para dar un ave transgénica es un gen de anticuerpo.

Cuando se usa una gallina o codorniz como el ave en la cual se va a introducir el gen, la proteína deseada puede obtenerse en los huevos de manera productiva y estable. Realizaciones adicionales de la invención se definen en las reivindicaciones dependientes.

- 5 Aunque el locus, en el cromosoma, del gen introducido mediante microinyección no puede especificarse, es posible identificar progenitores G0 capaces de producir eficazmente aves G1 clasificando quimeras de linaje reproductor que tienen el gen insertado en el sistema reproductor de entre las quimeras transgénicas G0 construidas. En dicha clasificación es eficaz un método que comprende recoger esperma de machos G0 mediante masaje abdominal y ensayar el esperma en busca de la aparición del transgén en su interior. Este método de clasificación también  
10 constituye un aspecto de la presente descripción.

La invención describe, por lo tanto, un método para construir aves transgénicas ventajoso en la producción de anticuerpos.

El ave transgénica construida mediante dicho método puede utilizarse en la producción de un anticuerpo que pueda utilizarse como un fármaco, y similares.

- 15 A continuación, la invención se describe en detalle.

El ave transgénica G1 y/o una cría de la misma es una ave con un gen extraño introducido en su interior por medio de un vector retroviral de replicación deficiente y se caracteriza porque contiene el gen extraño uniformemente en sus células somáticas y expresa la proteína deseada que se origina en el transgén de forma estable en su sangre o en la clara o la yema del huevo.

- 20 El ave que se usará en la puesta en práctica de la invención no está particularmente restringida pero pueden mencionarse, por ejemplo, gallinas, pavos, patos, avestruces, codornices y otras aves domésticas y aves de compañía domesticadas con el fin de de carne para alimentación y/o recogida de huevos. Entre éstas, gallinas y codornices están fácilmente disponibles y son fecundas como especies ponedoras de huevos y, por lo tanto, se prefieren.

- 25 Como vector retroviral que se usará en la puesta en práctica de la invención, pueden mencionarse vectores obtenidos de virus de la leucemia murina de Moloney (VLMMo), virus de leucosis aviar (VLA) y similares, y vectores de lentivirus, y similares. Entre ellos, se prefieren los obtenidos de VLMMo, aunque el vector retroviral que se usará no está limitado a estos.

- 30 Desde el punto de vista de la seguridad, un vector con capacidad de autorreplicación deficiente como resultado de la deficiencia de cualquiera de los tres genes gag, pol y env, que son necesarios para la replicación de partículas virales, se usa generalmente como vector para la transferencia génica. Se prefiere para infectar eficazmente células de ave con este vector viral, un vector viral con su proteína de la envuelta pseudotipada artificialmente como VSV-G (obtenida del virus de la estomatitis vesicular). El vector viral que se usará en la puesta en práctica de la invención no está limitado a este tipo viral, sin embargo.

- 35 El vector de pseudotipo viral preparado utilizando células empaquetadoras, un virus ayudante o similares se introduce en el embrión temprano, en un vaso sanguíneo y el corazón, mediante la técnica general de microinyección (Bosselman, R. A. et al. (1989), Science, 243, 533). Son concebibles como otras técnicas de transferencia génica las técnicas de lipofección y electroporación, y similares.

- 40 El gen que se introducirá en aves en la puesta en práctica de la invención puede estar constituido por un gen marcador, el gen estructural para la expresión de un anticuerpo, un gen promotor para controlar la expresión de dichos genes y un gen de señal de secreción.

El gen marcador es, por ejemplo, el gen de resistencia a neomicina, el gen de  $\beta$ -galactosidasa, o el gen que codifica una proteína fluorescente tal como GFP (proteína verde fluorescente).

- 45 El gen estructural para la expresión de un anticuerpo deseado es útil en la industria genética, por ejemplo codifica anticuerpos monoclonales humanos.

En particular, genes estructurales para anticuerpos extrínsecos, por ejemplo genes para anticuerpos que tienen la región constante de clase de IgG humana o genes para anticuerpos que tienen la región constante de subclase de IgG1 humana, IgG2 de codorniz, IgG2 de gallina o IgG2 de ratón se prefieren en vista de la buena capacidad de acumulación de dichos anticuerpos en los huevos.

- 50 Como los genes estructurales mencionados anteriormente que se prefieren, pueden mencionarse genes estructurales para anticuerpos quiméricos. La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que tiene dos o más caracteres heredados diferentes. Los anticuerpos para uso médico como los producidos por hibridomas murinos presentan un problema en que, cuando se administran al cuerpo humano, pueden provocar la reacción de

rechazo por el sistema inmunitario, dado que son de origen murino. Para superar esta desventaja, la parte de Fc etc., de un anticuerpo murino se humaniza, por ejemplo, mediante la técnica de recombinación, con lo cual el riesgo de rechazo puede reducirse marcadamente.

5 Como los anticuerpos quiméricos mencionados anteriormente, pueden mencionarse, por ejemplo, anticuerpos anti-CD2 humano, anticuerpos anti-receptor CD 20, y anticuerpo anti-TNF. Algunos de ellos ya se han comercializado como medicamentos.

10 Un ejemplo más preferido del gen estructural mencionado anteriormente es el gen estructural para el anticuerpo scFv-Fc. Como anticuerpos recombinantes para uso médico, también hay un grupo de los llamados anticuerpos de bajo peso molecular. La inmunoglobulina IgG comprende un dominio constituido por un heterodímero VH-VL llamado región variable (Fv: fragmento de región variable) que se une directamente a un antígeno, y este dominio Fv tiene, por sí mismo, un nivel suficiente de capacidad de unión al antígeno a pesar de tener aproximadamente un quinto del peso molecular en comparación con IgG. El producto de la unión artificial junto con el los dominios VH y VL por medio de un enlazador peptídico es un anticuerpo de bajo peso molecular llamado anticuerpo de cadena sencilla (scFv: Fv de cadena sencilla), que se ha sabido que tiene mejor estabilidad en comparación con el VH o VL en solitario.

15 Powers et al., (Powers, D. B. et al. (2000), J. Immunol. Methods, 251, 123) descubrieron que, cuando este scFv está fusionado a la parte Fc obtenida de IgG1 humana, la estabilidad en sangre mejora. Se piensa que este anticuerpo scFv-Fc es útil para fines médicos pero no puede producirse en *Escherichia coli*, que es un sistema de producción en masa económico.

20 Cuando dicho gen de anticuerpo monoclonal humano, gen de anticuerpo quimérico o gen de anticuerpo scFv-Fc, por ejemplo, se usa como el gen que se introducirá en aves de acuerdo con la invención, aquellos fármacos de anticuerpo que han sido difíciles de producir, pueden producirse en grandes cantidades en las aves quiméricas transgénicas G0 de la invención.

25 En el caso de aves quiméricas transgénicas G0 obtenidas mediante la introducción de un gen de anticuerpo quimérico, por ejemplo, el contenido de anticuerpo en sangre es, preferentemente, no inferior a 0,5 µg/ml, más preferentemente no inferior a 5 µg/ml. El contenido de anticuerpo en clara de huevo es, preferentemente, no inferior a 0,1 µg/ml, más preferentemente no inferior a 1 µg/ml, y el contenido de anticuerpo en yema de huevo es, preferentemente, no inferior a 0,1 µg/ml, más preferentemente no inferior a 1 µg/ml.

30 En el caso de aves quiméricas transgénicas G0 que resultan de la introducción de un gen de scFv-Fc, el contenido de anticuerpo en sangre es, preferentemente, no inferior a 20 µg/ml, más preferentemente no inferior a 2000 µg/ml. El contenido de anticuerpo en clara de huevo es, preferentemente, no inferior a 5 µg/ml, más preferentemente no inferior a 500 µg/ml. El contenido de anticuerpo en yema de huevo es, preferentemente, no inferior a 1 µg/ml, más preferentemente no inferior a 100 µg/ml. Aunque el anticuerpo acumulado en la yema se descompone enzimáticamente, por ejemplo, el contenido mencionado anteriormente es el valor dado bajo la suposición de que el anticuerpo no experimenta dicha descomposición. La descomposición de anticuerpo en yema de huevo puede evitarse, por ejemplo, añadiendo un inhibidor enzimático en una fase temprana o modificando la estructura susceptible a descomposición.

35 Como el gen promotor mencionado anteriormente, pueden mencionarse promotores constitutivos. En casos en los que el gen de anticuerpo está bajo el control de un promotor constitutivo, la expresión del gen de anticuerpo es favorablemente estable. Como un promotor constitutivo más preferido, puede mencionarse el promotor de β-actina de gallina. Cuando la expresión está bajo el control del promotor de β-actina, la proteína deseada se expresa de forma característica en sangre.

40 Cuando, en la producción de proteínas en animales transgénicos, la proteína deseada se produce en leche o en huevos, el nivel de producción de proteínas no puede estimarse hasta el comienzo de la lactancia o la puesta de huevos, como resultado de la maduración sexual; esto es una desventaja. Se requieren varios años para la maduración sexual en algunos casos, dependiendo de la especie animal, y esto es un factor inestable en la producción comercial planificada de una proteína deseada. A este respecto, el uso de aves transgénicas en las que la expresión de la proteína está bajo el control del promotor de β-actina hace posible conocer de forma predecible el nivel de la expresión de proteína en huevos después de la maduración sexual examinando el nivel de expresión de proteínas en sangre en la fase de aves juveniles. La clasificación de aves en base a los resultados obtenidos servirá como factor positivo en la producción de proteínas planificadas.

45 El método de producción de proteínas se caracteriza porque una proteína deseada se recupera del ave transgénica mencionada anteriormente. Más particularmente, éste es un método de producción de proteínas que comprende recuperar y purificar la proteína deseada de células somáticas, sangre y/o huevos del ave transgénica construida. Además, los huevos puestos por el ave transgénica también constituyen un aspecto de la presente descripción. El contenido de la proteína deseada en los huevos mencionados anteriormente es, preferentemente, no inferior a 1

mg/100 g, más preferentemente no inferior a 20 mg/100 g, de forma particularmente preferente no inferior a 100 mg/100 g.

A continuación, se describen métodos para construir aves quiméricas transgénicas G0 que son progenitoras de las aves transgénicas G1 y su descendencia.

- 5 Como método de construcción de la invención, el método de construcción comprende incubar huevos de ave fertilizados, infectar el embrión temprano de cada huevo con el vector retroviral de replicación deficiente al menos 48 horas, después del comienzo de la incubación, y dejar que el embrión eclosione.

El método comprende microinyectar el vector retroviral de replicación deficiente en el corazón formado en el embrión temprano mencionado anteriormente.

- 10 Respecto al desarrollo temprano de huevos fertilizados después de la puesta de huevos en gallinas, por ejemplo, el huevo fertilizado en primer lugar en el oviducto comienza a escindirse en aproximadamente 1,5 horas después de la fertilización. Después del inicio de la escisión discoidal mientras se mantiene la conexión con el citoplasma, la escisión continúa durante un día hasta la liberación del huevo del cuerpo y el huevo forma, de este modo, un embrión llamado blastodermo constituido por aproximadamente 60 mil células (fase blastodérmica). Este  
15 blastodermo se observa como un anillo blanco con un diámetro de 3 a 4 mm en el centro de la yema. Este embrión se divide en las capas superior e inferior para formar una cavidad de segmentación. La puesta del huevo se produce casi en el momento de la formación del hipoblasto, se forma una línea primitiva, el blastodermo asume una estructura de tres capas (superior, media e inferior) y, de este modo, se forman tres capas germinales. Seguidamente, la formación y el crecimiento del embrión continúan, y el huevo eclosiona el 22° día después de la  
20 oviposición. La fase blastodérmica también se denomina fase X y se forman células reproductoras por parte de células en esta fase y, por lo tanto, el huevo fertilizado en esta fase se usa en la técnica anterior como la diana de la transferencia génica.

- Los inventores de la presente invención colocaron huevos fertilizados en la fase blastodérmica justo después de la puesta de huevos en condiciones de incubación, por ejemplo en condiciones ambientales adecuadas para la  
25 incubación en el caso de gallinas, por ejemplo, concretamente a una temperatura de 37,7 a 37,8°C y una humedad de aproximadamente el 50 al 70%, y realizaron microinyección a intervalos cronometrados, con el tiempo de colocación en dichas condiciones de incubación siendo tomado como la hora 0. Tras 36 horas después del comienzo de la incubación en el caso de codornices o tras aproximadamente 50 horas después del comienzo de la incubación en el caso de gallinas, la formación de un sistema circulatorio sanguíneo se observó en la yema y podía  
30 observarse el pulso del órgano que se diferenciaría en el corazón.

Es aplicable a la incubación del huevo fertilizado mencionado anteriormente después de la introducción del gen, por ejemplo, el método que usa una cáscara de huevo artificial según lo desarrollado por los inventores de la presente invención (Kamihara, M. et al. (1998), Develop. Growth Differ., 40, 449).

- 35 Como vector retroviral de replicación deficiente, el gen que se introducirá y el ave que se hará transgénica, que se usarán en el método de construcción de la invención, pueden mencionarse los mismos que se han mencionado anteriormente en referencia al ave quimérica transgénica G0.

En el método de construcción de la invención, el vector retroviral de replicación deficiente contiene un gen obtenido no de retrovirus.

En el método de construcción de la invención, el "gen obtenido no de retrovirus" codifica un anticuerpo

- 40 El gen obtenido no de retrovirus es, preferentemente, uno bajo el control del promotor de  $\beta$ -actina de gallina.

En el método de construcción de la invención, es preferible microinyectar un vector retroviral de replicación deficiente que tiene, preferentemente, un valor cuantitativo no inferior a  $1 \times 10^7$  ufc/ml, más preferentemente no inferior a  $1 \times 10^8$  ufc/ml, aún más preferentemente no inferior a  $1 \times 10^9$  ufc/ml, dado que el gen puede introducirse a continuación eficazmente.

- 45 En el método de construcción de la invención, el ave que resulta de un huevo fertilizado con un gen introducido se desarrolla en su interior como un ave transgénica que porta el transgén en forma de mosaico en sus células somáticas. Esta ave transgénica de primera generación se denomina ave quimérica transgénica G0.

- 50 La segunda generación o tercera generación nacen después del apareamiento de dicha ave quimérica transgénica G0 con un ave no transgénica o el apareamiento de aves quiméricas transgénicas G0 entre sí, cuando se desarrollan a partir de una célula reproductora que tiene el transgén en uno de sus cromosomas, se desarrolla como un individuo cuyas células somáticas en todo el cuerpo contienen el transgén. La descendencia que hereda el transgén de estos individuos quiméricos de linaje reproductor se denomina como, de generación a generación, aves transgénicas G1, G2, G3 y similares.

5 Mediante el apareamiento del ave quimérica transgénica G0 construida de acuerdo con la invención con un ave no transgénica de la misma especie o un apareamiento con un ave quimérica transgénica G0, es posible propagar el transgén a su descendencia y, al mismo tiempo, construir aves transgénicas perfectas que portan el transgén en células somáticas en todo el cuerpo. Al establecer una línea de aves transgénicas capaz de propagar de forma estable el transgén de esa manera, se vuelve posible estabilizar su calidad como sistema de producción de productos. Además, puede esperarse que un ave transgénica perfecta, que tiene una alta proporción de células somáticas que portan el transgén, proporcione una mayor producción de la proteína recombinante debida al transgén en algunos casos, en comparación con el ave quimérica transgénica G0.

10 El método para construir aves transgénicas G1 de acuerdo con la invención comprende construir el ave quimérica transgénica G0 mencionada anteriormente y aparear un macho transgénico G0 y una hembra de tipo silvestre. Además, la cría por retrocruzamiento usando descendencia y sus progenitores también es posible.

15 Recogiendo esperma del macho G0 y comprobando en el mismo la aparición o no aparición del transgén en su interior, es posible clasificar quimeras de linaje reproductor. Los métodos concebibles de ensayo en busca del transgén incluyen, aunque sin limitarse a, la técnica de PCR y la técnica de transferencia de Western, y similares.

20 También se describe un método para clasificar quimeras de linaje reproductor que comprende recoger muestras de esperma de aves transgénicas G1 macho, aves transgénicas G2 macho o sus descendientes machos y ensayar en ellos en busca del gen en el esperma de la misma manera.

25 Cuando la quimera de linaje reproductor es un macho, la quimera se produce como un individuo que tiene tanto espermatozoides que portan el transgén como espermatozoides que no portan el transgén. Un ave joven que ha madurado a partir de un embrión fertilizado con un espermatozoide que porta el transgén se convierte en una G1 transgénica que porta el transgén en todas sus células somáticas. Clasificando aves G0 quiméricas de linaje reproductor, se hace posible construir aves quiméricas transgénicas G1 de forma más eficaz en comparación con el apareamiento aleatorio.

#### (EFECTOS DE LA INVENCION)

30 El ave transgénica G1 y su descendencia pueden expresar eficazmente un gen extraño introducido por medio de un vector retroviral de replicación deficiente altamente seguro, sin inactivación del producto de expresión.

Además, las aves transgénicas G1 portan el transgén existente en todas las células somáticas y permiten la expresión estable de la proteína correspondiente a nivel individual y, además, dichas aves, como linaje establecido, puede servir como un sistema de suministro estable.

35 Además, el método para construir aves transgénicas de acuerdo con la invención hace posible construir de forma segura y eficaz aves transgénicas G1 y, además, como su descendencia, aves transgénicas G2 y G3.

40 Las aves transgénicas G1, G2, G3 y de generaciones posteriores expresan la proteína debida al gen extraño en sus células somáticas y, cuando la proteína se recupera y se purifica del suero, clara de huevo y/o yema de huevo, esas aves pueden suministrar un sistema de producción económico para proteínas o anticuerpos con una cadena glucídica añadida que, hasta la fecha, han sido difíciles de producir.

#### BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

45 [Figura 1] Esta figura muestra la estructura de la construcción de vector de expresión de anticuerpo scFv-Fc pMSCV/GΔAscFv-Fc. Amp<sup>r</sup> indica el gen de resistencia a ampicilina. PΔact indica el gen promotor de β-actina. ψ+ indica una secuencia señal empaquetadora. GFP indica el gen de proteína verde fluorescente. scFv-Fc indica el gen del anticuerpo scFv-Fc. 5'LTR y 3'LTR respectivamente indican las secuencias de repetición terminal larga del VLMMo.

[Figura 2] Esta figura muestra los resultados del análisis, mediante PCR, del transgén en extractos del genoma de diversos órganos de una gallina transgénica G1. M indica un marcador, C1 un control positivo, y C2 un control negativo. L, K, H, MU e I indican hígado, riñón, corazón, músculo e intestino, respectivamente. GFP indica el gen de proteína verde fluorescente y OVA indica el gen de ovoalbúmina.

[Figura 3] Esta figura muestra los resultados de análisis FISH de las gallinas transgénicas G1 #77 y #103. Cada flecha indica el transgén (pMSCV/scFv-FΔ6BamHI).

#### MEJORES MODOS DE REALIZAR LA INVENCION

50 Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención en detalle. Estos ejemplos no son, sin embargo, en absoluto del alcance de la presente invención.

(Ejemplo 1) Formación de una construcción de vector de expresión del anticuerpo scFv-Fc

## ES 2 380 804 T3

Una construcción de vector de expresión del anticuerpo scFv-Fc se preparó de la siguiente manera.

1. Un fragmento que contiene una serie del promotor de fosfoglicerato quinasa (PGK) murina y el gen Neo<sup>r</sup> se eliminó de pMSCVneo (producto de Clontech Laboratories, Inc.) usando las enzimas de restricción BglII y BamHI, y se dejó que el fragmento del vector restante se auto-ligara para construir el plásmido pMSCV.
- 5 2. Un fragmento del gen de GFP se escindió de pGREEN LANTERN-1 (producto de Gibco BRL) con la enzima de restricción NotI y se insertó en pZeoSV2(+) (producto de Invitrogen Corporation) en el sitio de NotI. Un plásmido que tenía una estructura resultante de la inserción del gen de GFP en la misma dirección que el promotor T7 se denominó pZeo/GFP.
- 10 3. Un fragmento del gen de GFP se escindió de pZeo/GFP con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI y se unió a un fragmento de vector de pMSCV tratado con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI para construir un plásmido, pMSCV/G.
- 15 4. Un fragmento del promotor  $\Delta$ Act se amplificó a partir de pMiwZ (Suemori et al., 1990, Cell Diff. Dev. 29: 181-185) mediante PCR (94°C/15 segundos  $\rightarrow$  50°C/30 segundos  $\rightarrow$  68°C/1 minuto: 10 ciclos; 94°C/15 segundos - 62°C/30 segundos  $\rightarrow$  68°C/1 minuto: 30 ciclos; KOD-Plus-ADN polimerasa (producto de Toyobo Co., Ltd.)) usando, como cebadores, dos oligonucleótidos sintetizados químicamente, 5'-acgcgtcgcagctgcatgcacgctcattg-3' (SEC ID N° 1, siendo la parte subrayada el sitio de la enzima de restricción Sall) y 5'-acgcgtcgcacaacgcagcagctccc-3' (SEC ID N° 2, siendo la parte subrayada el sitio de la enzima de restricción Sall). El fragmento del promotor  $\Delta$ Act se escindió a continuación usando la enzima de restricción Sall y se insertó en pETBlue-2 (producto de Novagen) en su sitio de Sall, con lo cual se construyó un plásmido, pETBlue/ $\Delta$ Act.
- 20 5. El fragmento del promotor  $\Delta$ Act se escindió de pETBlue/ $\Delta$ Act con la enzima de restricción Sall y se insertó en pMSCV/G en su sitio de XhoI. Un plásmido que tenía una estructura resultante de la inserción del promotor  $\Delta$ Act en la misma dirección que el gen de GFP se denominó pMSCV/G $\Delta$ A.
- 25 6. Un fragmento del gen de señal de secreción de lisozima se preparó hibridando conjuntamente dos oligonucleótidos sintetizados químicamente fosforilados en el extremo 5', 5'-ctagaccatgaggtcttctgtaactcttggtgcttctctcctcccctggctgctc tgggg-3' (SEC ID N° 3, siendo la parte subrayada el extremo XbaI y siendo la parte subrayada el extremo HaeIII) y 5'-cccagagcagccaggggaggaagcaagcaccagattagcaagacctcatgg t-3' (SEC ID N° 4, siendo la parte subrayada el extremo XbaI y siendo la parte subrayada el extremo HaeIII). Un fragmento del gen de scFv se amplificó a partir del plásmido pPDS/scFv (Nakamura et al., 2000, Cytotechnology 32: 191-198) que contenía un gen de anticuerpo de cadena sencilla (scFv) preparado a partir del gen de región variable de anticuerpo de gallina de células HUC213 mediante PCR (94°C/15 segundos  $\rightarrow$  58°C/30 segundos  $\rightarrow$  68°C/1 minuto: 30 ciclos) usando, como cebadores, dos oligonucleótidos sintetizados químicamente, 5'-gcggttaaagtgcagcttgagcgtccg-3' (SEC ID N° 5, siendo la parte subrayada el sitio de la enzima de restricción DraI) y 5'-attagatccgcgcttaaggcaggtcagg-3' (SEC ID N° 6, siendo la parte subrayada el sitio de la enzima de restricción BamHI), y el fragmento del gen se escindió a continuación usando las enzimas de restricción DraI y BamHI. Los dos fragmentos preparados de la manera anterior se insertaron en pBluescriptIIISK(+) (producto de Stratagene) en su sitio de XbaI-BamHI para construir un plásmido, pBlue/scFv.
- 30 7. Un fragmento del gen de scFv se escindió de pBlue/scFv con las enzimas de restricción NotI y BamHI y se insertó en pCEP4 (producto de Invitrogen Corporation) en su sitio de NotI-BamHI para construir un plásmido, pCEP4/scFv.
- 40 8. Se recogió ARNm de las células de mieloma que producen IgG1 humana IM-9 (*Japanese Collection of Research Bioresources* [Colección Japonesa de Recursos Biológicos de Investigación] 0024) usando un kit de aislamiento de ARNm (producto de Roche), y se construyó una biblioteca de ADNc a partir del ARNm obtenido usando ReverTra Ace (producto de Toyobo Co., Ltd.). Un fragmento del gen hC $\gamma$ 1 se amplificó a partir la anterior biblioteca de ADNc mediante PCR (95°C/2 minutos  $\rightarrow$  52°C/30 segundos - 74°C/3 minutos: 30 ciclos; Pfu ADN polimerasa (producto de Promega)) usando, como cebadores, dos oligonucleótidos sintetizados químicamente, 5'-caagcttcaaggcccat-3' (SEC ID N° 7) y 5'-atttaccggagacagga-3' (SEC ID N° 8). Además, un fragmento génico (FC) de la región FC de cadena  $\gamma$ 1 de anticuerpo H humano se amplificó a partir del anterior producto de PCR mediante PCR.(94°C/15 segundos  $\rightarrow$  58°C/30 segundos  $\rightarrow$  68°C/1 minuto: 30 ciclos; KOD-plus-ADN polimerasa) usando, como cebadores, los oligonucleótidos sintetizados químicamente, 5'-attagatccgagcccaaatcttctgacaaaactc-3' (SEC ID N° 9, siendo la parte subrayada el sitio de la enzima de restricción BamHI) y 5'-agcaagcttcatctaccggagacagga-3' (SEC ID N° 10, siendo la parte subrayada el sitio de la enzima de restricción HindIII), seguido por escisión con las enzimas de restricción BamHI y HindIII. El fragmento escindido se insertó en pBluescriptIIISK(+) en el sitio de BamHI-HindIII para construir un plásmido, pBlue/Fc.
- 45 9. Un fragmento del gen de scFv se escindió de pCEP4/scFv con las enzimas de restricción HindIII y BamHI. Un fragmento del gen de Fc se escindió de pBlue/Fc con las enzimas de restricción BamHI y HindIII. Los dos fragmentos escindidos de este modo se insertaron en pBluescriptIIISK (+) en el sitio de HindIII para construir un plásmido, pBlue/scFv-Fc.
- 50 55

10. Un fragmento génico que tenía una estructura resultante de la conexión de la cadena  $\gamma 1 \cdot \text{Fc}$  del anticuerpo H humano con la región variable del anticuerpo de cadena sencilla de gallina se escindió de pBlue/scFv-Fc con la enzima de restricción HindIII y se ligó a un fragmento de vector preparado mediante tratamiento de pMSCV/G $\Delta$ A con la enzima de restricción HindIII. Un plásmido que tenía una estructura resultante de la unión del gen de scFv-Fc en la misma dirección que el promotor  $\Delta$ Act se denominó pMSCV/G $\Delta$ AscFv-Fc.

La estructura de la construcción vectorial obtenida de vector retroviral de replicación deficiente, pMSCV/G $\Delta$ AscFv-Fc, se muestra en la figura 1.

(Ejemplo 2) Preparación de un vector retroviral de expresión del anticuerpo scFv-Fc

Para preparar un vector retroviral a partir de la construcción vectorial pMSCV/G $\Delta$ AscFv-Fc construida en el Ejemplo 1,  $5 \times 10^6$  células empaquetadoras GP293 (producto de Clontech Laboratories, Inc.) se sembraron y se cultivaron en una placa de cultivo que tenía un diámetro de 100 mm. El medio se sustituyó por DMEM fresco (medio Eagle modificado de Dulbecco), y 8  $\mu\text{g}$  del vector pVSV-G (producto de Clontech Laboratories, Inc.) y 8  $\mu\text{g}$  de pMSCV/G $\Delta$ AscFv-Fc se introdujeron en las células GP293 anteriores mediante la técnica de lipofección. Después de 48 horas, el sobrenadante de cultivo que contenía partículas virales se recuperó y se le retiraron los contaminantes haciéndole pasar a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  (producto de Advantech Co., Ltd.). Se añadió Polybrene (producto de Sigma) a la solución obtenida a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y la mezcla resultante se usó como solución viral.

La solución viral preparada se añadió a células GP293 cultivadas por separado y, después de 48 horas de cultivo, las células se clonaron mediante el método de la dilución limitante. De este modo, se obtuvo una cepa transformante estable GP293 capaz de expresar fuertemente GFR.

La cepa transformante estable obtenida se cultivó en una placa con un diámetro de 100 mm hasta un estado confluyente al 80%, y 16  $\mu\text{g}$  de pVSV-G se introdujeron en ella mediante la técnica de lipofección. Después de 48 horas, se recuperaron 12 ml de un sobrenadante de cultivo que contenía partículas virales.

Este sobrenadante de cultivo se centrifugó a  $50.000 \times g$  y a  $4^\circ\text{C}$  durante 1,5 horas para sedimentar las partículas virales. El sobrenadante se retiró, 50  $\mu\text{l}$  de una solución que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7,8) NaCl 130 mM y EDTA 1 mM se añadió al precipitado que contenía las partículas virales y, después de reposar durante una noche a  $4^\circ\text{C}$  y después de una suspensión minuciosa, se recuperó una solución viral. El vector viral de alto valor cuantitativo obtenido de este modo mostraba un valor cuantitativo de  $10^8$  a  $10^9$  ufc/ml.

El valor cuantitativo viral se midió de la siguiente manera. El día antes de la medición,  $7 \times 10^4$  células NIH3T3 (obtenidas de la *American Type Culture Collection* [Colección Americana de Cultivos Tipo]) se sembraron y se cultivaron en cada placa con un diámetro de 35 mm. Una solución viral diluida de  $10^2$  a  $10^6$  veces (1 ml) se añadió a cada placa y, después de 48 horas, la proporción (tomándose el 100% como 1) de células que expresan GFP se determinó usando un microscopio fluorescente. El valor cuantitativo se determinó de acuerdo con la siguiente fórmula de cálculo:

Valor cuantitativo viral = número de células  $\times$  factor de dilución  $\times$  proporción de expresión (ufc/ml)

(Ejemplo 3) Inyección del vector retroviral en embriones de gallina

Se usaron huevos de gallina fertilizados (*Nippon Institute for Biological Science* [Instituto Nipón de Ciencias Biológicas]). Estos huevos fertilizados se colocaron en un entorno de  $37,9^\circ\text{C}$  y el 65% de humedad en una incubadora (*Showa Furanki* modelo P-008) con un dispositivo automático de volteo de huevos incorporado. El momento de dicha colocación se tomó como el tiempo de inicio de la incubación (hora cero) y, seguidamente, la incubación se realizó mientras los huevos se giraban 90 grados a intervalos de 15 minutos.

Para la inyección del gen, la cáscara de huevo de cada huevo fertilizado se desinfectó con etanol al 70% y una parte circular con un diámetro de 3,5 cm se cortó de su parte del extremo puntiagudo con un cortador de diamante (Minomo 7C710, producto de MINITOR CO.; LTD) para dejar expuesto al embrión. A aproximadamente la hora 50ª después del comienzo de la incubación, se observó el desarrollo de vasos sanguíneos en la superficie de la yema de huevo y podía observarse en un microscopio estereoscópico que una parte de ella tenía pulso, convirtiéndose de este modo en un primordio del corazón. Mientras se observaba dicha fase inicial en un microscopio estereoscópico, una aguja fabricada procesando un tubo de vidrio (CD-1, producto de OLYMPUS CORPORATION) usando un aparato de fabricación de micropipetas (PC-10, producto de OLYMPUS CORPORATION) y rompiendo la punta de modo que el diámetro externo podría convertirse en aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  se pegó en el medio de la cavidad bajo el disco germinal y aproximadamente 2  $\mu\text{l}$  de la solución viral preparada en el Ejemplo 2 se micropipetearon en esa cavidad usando un microinyector (Transjector 5246, producto de Eppendorf Co., Ltd.). la cáscara de huevo se llenó con clara de huevo hasta la abertura realizada cortando, y la abertura se tapó con una membrana de Teflón (MilliWrap, producto de Millipore Corporation) y una envuelta de cloruro de polivinilideno (Saran Wrap, producto de Asahi Kasei Corporation) usando clara de huevo como una pasta. La incubación se realizó a continuación haciendo girar al huevo 90 grados a intervalos de 30 minutos.

El 18º día después del comienzo de la incubación, se detuvo el volteo de los huevos, y el 21º día, cuando el polluelo empieza a picotear la cáscara, la cáscara de huevo se rompió artificialmente para ayudar en la eclosión. La capacidad de eclosión en dicha eclosión artificial era del 50 al 60%.

(Ejemplo 4) Ensayo del anticuerpo scFv-Fc en suero mediante ELISA

- 5 Los polluelos quiméricos transgénicos G0 nacidos en el Ejemplo 3 se alimentaron para que crecieran. Después de una semana, se recogieron muestras de sangre de los polluelos macho desarrollados (números de identificación de los individuos: #1111, #3108 y #4102) mediante la vena debajo del ala. Cada muestra de sangre obtenida se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 minutos, y el suero obtenido como sobrenadante se evaluó para comprobar el valor cuantitativo de anticuerpo scFv-Fc.
- 10 Un anticuerpo anti IgG humana (producto de Cosmo Bio Co., Ltd.) diluido con PBS se distribuyó en partes de 100 µg en pocillos de una placa de ELISA, seguido por reposo durante una noche a 4°C. Cada pocillo se lavó con tres partes de 200 µl de una solución al 0,05% de Tween 20 en PBS y a continuación 150 µl de Pubs-Tween 20 al 0,05% a leche desnatada al 2% se añadió a cada pocillo.
- 15 Después de 2 horas de reposo a temperatura ambiente, cada pocillo se lavó con tres partes de 200 µl de PBS-Tween 20 al 0,05%, y se le añadieron 120 µl de la muestra de sangre recogida, seguido por reposo durante una noche a 4°C. Esta placa de ELISA se devolvió a temperatura ambiente, cada pocillo se lavó con tres partes de la solución de PBS-Tween 20, 100 µl de anticuerpo anti-IgG humana marcado con peróxido (POD) (producto de Cosmo Bio Co., Ltd.) diluido con PBS-Tween 20 al 0,05% se añadieron a cada pocillo, y se dejó reposar a la placa a temperatura ambiente durante 1 hora.
- 20 Cada pocillo se lavó con cuatro partes de Pubs-Tween 20 al 0,05%, y 100 µl de una solución reveladora del color (preparada disolviendo 10 mg de o-fenilendiamina (producto de Katayama Chemical Industries Co., Ltd.) en 1 ml de metanol, llevando el volumen a 100 ml con agua destilada y añadiendo 10 µl de una solución acuosa de peróxido de hidrógeno (producto de Wako Pure Chemical Industries Ltd.)) se añadieron a cada pocillo. La reacción se interrumpió añadiendo 50 µl de ácido sulfúrico 8 M a cada pocillo, la intensidad de fluorescencia a 490 nm se midió usando un lector de placas, y la concentración se determinó en base a una curva patrón de trabajo. La media de las concentraciones de anticuerpo en las muestras obtenidas de tres codornices o polluelos se presentó como el resultado.
- 25 El anticuerpo patrón (producto de Cosmo Bio Co., Ltd.) para la construcción de la curva patrón de trabajo se diluyó con yema de huevo-PBS al 50% (p/v).
- 30 La curva patrón de trabajo se construyó usando scFv-Fc purificado. La construcción vectorial pMSCV/scFv-Fc construida en el Ejemplo 1 se introdujo en células GP293 mediante la técnica de lipofección, y el sobrenadante de cultivo obtenido de la misma se centrifugó (4°C, 10 minutos, 3.000 rpm) para retirar la materia sólida. Mientras se refrigeraba y se agitaba este sobrenadante, sulfato de amonio finamente triturado al 50% de saturación se añadió gradualmente (313 g sulfato de amonio/1.000 ml de agua) para la precipitación de proteínas. Esto se dejó reposar durante una noche a 4°C y a continuación se centrifugó a 15.000 rpm y a 4°C durante 10 minutos para hacer que el precipitado sedimentara completamente. El precipitado se disolvió en una pequeña cantidad de PBS. La solución se dializó contra 2 l de PBS tres veces para retirar el sulfato de amonio.
- 35 Una columna de proteína G para purificación (producto de NGK INSULATORS LTD.) se lavó inicialmente con 10 ml de tampón de unión (NaHPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O 1,56 g/l, NaHPO<sub>4</sub>•12H<sub>2</sub>O 7,16 g/l), 10 ml de tampón de lavado (ácido acético 20%, agua destilada 80%) y 10 ml de Tampón de unión en ese orden (caudal 2 ml/minuto). Una solución de la proteína disuelta en PBS se hizo pasar a través de la columna a 1 ml/minuto para que el scFv-Fc se adsorbiera a la columna. Las proteínas innecesarias se retiraron haciendo pasar a 20 ml de tampón de unión a 1,7 ml/minuto, y el scFv-Fc se eluyó haciendo pasar Tampón de elución (glicina 7,507 g/ajustado a pH 2,5 a 3,0 con HCl 1,2 N) a 1,5 ml/minuto.
- 40 Cada fracción de eluato se dializó contra PBS (2 l) tres veces y el scFv-Fc purificado de este modo se ensayó para la concentración de proteínas en base a la absorbancia a la longitud de onda 280 nm. Los niveles de anticuerpo en sangre en los tres polluelos quiméricos transgénicos macho G0 nacidos en el Ejemplo 3 (números de identificación de los individuos. #1111, #3108 y #4102) se muestran en la Tabla 1.
- 45

Tabla 1

Nº de Id. del Individuo	Nivel de anticuerpo en sangre
#1111	1,6 mg/ml
#3108	1,6 mg/ml

#4102

1,5 mg/ml

## (Ejemplo 5) Confirmación del transgén en esperma mediante PCR

5 Los tres polluelos quiméricos transgénicos macho G0 nacidos en el Ejemplo 3 (números de identificación de los individuos #1111, #3108 y #4102) se alimentaron y se desarrollaron, esperando a la maduración sexual. Después de 6 meses, se recogieron 0,2 ml de esperma de cada una de las gallinas quiméricas transgénicas macho mediante masaje abdominal.

El transgén se confirmó mediante el método de PCR usando 50 ng del ADN genómico extraído de cada muestra de esperma recogida usando un kit (producto de Toyobo Co., Ltd., MagExtractor-genome-).

10 Una serie de cebadores que permiten la amplificación de una parte (393 pb) del fermento génico de scFv contenido en el transgén: 5'-GTCTTATTAGCGGTGCTGGTAGTAGCACAA-3' (SEC ID N° 11)/5'-GAGACTTCTGCTGGTACCAGCCATA-3' (SEC ID N° 12) y una serie de cebadores que permiten la amplificación de una parte (311 pb) del gen de GFP contenido en el transgén: 5'-AGCTCACCTGAAATTCATCTGCACCACTG-3' (SEC ID N° 13)/5'-GTTGTATTCCAGCTTGTGGCCGAGAATGTT-3' (SEC ID N° 14) se usaron en la PCR.

## (Ejemplo 6) Construcción de gallinas transgénicas G1 mediante apareamiento

15 Se permitió que una gallina quimérica transgénica G0 macho (#4102) en la que el transgén se había detectado en el esperma en el Ejemplo 5 se apareara con tres hembras de tipo silvestre (*white Leghorn*), y se obtuvieron huevos fertilizados.

20 Estos huevos fertilizados se incubaron en un entorno de 37,9°C y el 65% de humedad en una incubadora (*Showa Furanki* modelo P-008) con un dispositivo automático de volteo de huevos incorporado y, el 21° o 22° día, nacieron los polluelos. Estos polluelos fueron alimentados durante una semana y se recogieron muestras de sangre de 100 µl de la vena debajo de la cola. El suero se separó a partir de cada muestra de sangre y el nivel de anticuerpo en el suero se determinó mediante el método ELISA descrito en el Ejemplo 4. Además, el genoma se extrajo de cada sedimento de sangre obtenido mediante centrifugado mediante el método descrito en el Ejemplo 5, y el transgén se confirmó mediante el método de PCR.

25 Una serie de cebadores que permiten la amplificación de una parte (355 pb) del gen de GFP contenido en el transgén: 5'-CAACACTGGTCACTACCTTCACCTATG-3' (SEC ID N° 15)/5'-ACGGATCCATCCTCAATGTTGTGTC-3' (SEC ID N° 16) se usaron en la PCR. Como intervalo estándar, se usaron una serie de cebadores que permiten la amplificación de una parte (317 pb) del gen de ovoalbúmina contenido en el genoma de gallina: 5'-CGCTTTGATAAACTTCCAGGATTCGG-3' (SEC ID N° 17)/5'-CATCTAGCTGTCTTGCTTAAGCGTACA-3' (SEC ID N° 18).

30 Como resultado del ensayo del transgén en 110 polluelos, el transgén se detectó en 5 polluelos. El genoma se extrajo de cada órgano de un individuo G1 que había muerto accidentalmente, y el genoma se sometió a ensayos de confirmación del transgén mediante PCR.

## (Ejemplo 7) Confirmación del transgén en cada órgano en G1

35 Dado que uno de los individuos G1 construidos en los Ejemplo 6 y del que se confirmó que tenía el transgén en el genoma extraído de la sangre murió accidentalmente, el estómago, hígado, riñón, intestino y músculo se extirparon, y el genoma se extrajo de cada órgano mediante el método descrito en el Ejemplo 6 y se sometió a ensayos de confirmación del transgén mediante el método de PCR (Figura 2).

40 Los resultados obtenidos demostraban positivamente que este individuo era un individuo G1 que porta el transgén en cada órgano en el cuerpo.

Los niveles del anticuerpo scFv-Fc en sangre en las muestras de sangre de los cinco polluelos G1 se determinaron mediante el método descrito en el Ejemplo 4. En tres polluelos de entre ellos, el nivel de expresión del anticuerpo era de 1 mg/ml.

45 De este modo, se reveló que este método hace posible construir gallinas transgénicas G1 perfectas capaces de expresar un anticuerpo scFv-Fc debido al transgén y que portan el transgén en todas las células somáticas.

## (Ejemplo 8) Análisis cromosómico del G1 mediante FISH

50 Se descubrió que el 77° polluelo que había eclosionado en el Ejemplo 6 era un polluelo transgénico G1 (hembra) mediante el ensayo de PCR descrito en el Ejemplo 6. A este G1 se le adjudica el número de individuo #77. De la misma manera, se descubrió que el 103° polluelo era un polluelo transgénico G1 (macho) mediante el método de PCR (número de individuo #103).

5 Se recogieron muestras de sangre de estos dos polluelos G1 mediante la vena debajo del ala, y los linfocitos se separaron de 2 ml de cada muestra de sangre mediante el método Ficoll-Hypaque y se cultivaron en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C usando RPMI 1640 suplementado con un mitógeno (concanavalina A, producto de Cosmo Bio Co., Ltd.), mercaptoetanol (producto de Wako Pure Chemical Industries Ltd.), sulfato de kanamicina (producto de Cosmo Bio Co., Ltd.) y FBS al 18% (producto de Invitrogen Corporation). Varias horas antes de la preparación de la muestra cromosómica, BrdU (5-bromodesoxiuridina, producto de Merck Ltd.) se añadió al medio, colcemid (producto de Merck Ltd.) se añadió adicionalmente y, después de 1 hora, las células se recuperaron, se trataron con una solución hipotónica y se fijaron con una solución fijadora (metanol:ácido acético = 3:1) para dar una muestra.

10 Cada muestra cromosómica preparada se secó durante varios días, se tiñó con Hoechst 33258 (producto de Merck Ltd.) y, después del tratamiento con UV y el secado, se analizó mediante FISH. Una sonda de ADN (pMSCV/scFv-FcΔBamHI) se marcó con biotina (producto de Cosmo Bio Co., Ltd.), y se usó un sistema de anticuerpo anti-biotina de cabra/FITC-anti-IgG de cabra para la reacción de detección, la formación de imágenes se realizó usando un microscopio de fluorescencia (sistema Leica DMRA), y el análisis se realizó usando un analizador de imágenes (software Leica 550CW-QFISH).

15 El ADN de sonda (pMSCV/scFv-FcΔBamHI) se preparó escindiendo un fragmento BamHI-BamHI (1,57 kb) de pMSCV/scFv-Fc del Ejemplo 1 mediante tratamiento con la enzima de restricción y marcado con biotina de la manera convencional.

20 Los resultados obtenidos de este modo del análisis FISH del #77 y el #103 se muestran en la figura 3. A partir de estos resultados del análisis FISH se reveló que el individuo #77 era un G1 que portaba dos copias del transgén insertadas en el microcromosoma y que #103 era un polluelo transgénico G1 que porta una copia del transgén insertada en el brazo largo del tercer cromosoma.

(Ejemplo 9) Construcción de gallinas transgénicas G2 mediante apareamiento

25 El individuo G1 #77 (hembra) del Ejemplo 8 se apareó con un macho de tipo silvestre (*white Leghorn*) y el individuo #103 (macho) con una hembra de tipo silvestre (*white Leghorn*), y se dejó que los huevos fertilizados obtenidos eclosionaran. El genoma se extrajo de plasma de cada polluelo mediante el método del Ejemplo 5 y se analizó en cuanto a la presencia o ausencia del transgén mediante el método de PCR; por lo tanto, cada polluelo se ensayó para saber si era un polluelo transgénico G2.

30 Dado que el #77 era un G1 que portaba 2 copias del transgén en uno de los cromosomas, se esperaba desde el punto de vista de la probabilidad que tres cuartos de los polluelos nacidos como resultado de apareamiento con un tipo silvestre fueran transgénicos. Un cuarto deberían ser polluelos G2 que portarían dos copias del transgén, como el progenitor G1, y dos cuartos serían polluelos G2 que portarían solamente una de las copias del transgén que tenía el progenitor G1.

35 Durante el examen real de los polluelos que habían eclosionado, se descubrió que 14 de 20 polluelos eran G2 transgénicos, concretamente que los polluelos G2 habían nacido aproximadamente con una frecuencia esperada desde el punto de vista de la probabilidad.

40 De la misma manera, los polluelos nacidos a partir del apareamiento del G1 #103 con un tipo silvestre se ensayaron mediante el método de PCR. Dado que el #103 eran un G1 que portaba una copia del transgén, se anticipó que los polluelos G2 debían aparecer con una probabilidad de 1/2. Los resultados del ensayo real mostraron que 22 de 43 polluelos eran G2 transgénicos. Por lo tanto, se descubrió que polluelos G2 como se esperaba a partir del principio de probabilidad pueden nacer a partir de gallinas G1 transgénicas construidas de acuerdo con la presente invención.

45 Los polluelos G2 construidos se criaron, y el nivel de anticuerpos en huevos puestos por hembras y los niveles de expresión en sangre en las hembras se midieron mediante el método del Ejemplo 4. Los niveles de expresión de anticuerpos en sangre en individuos G2 (6 meses de edad), que eran descendientes de los G1 #77 y #103, se muestran en la Tabla 2 y la Tabla 3, respectivamente, y los niveles de expresión de anticuerpos en huevos puestos por hembras G2 de 6 meses de edad nacidas del #77 se muestran en la Tabla 4.

Tabla 2

Niveles de anticuerpo scFv-Fc en sangre en G2 de #77	
Nº de Id. del individuo	Nivel de anticuerpo en sangre
#77-3	0,63 mg/ml
#77-5	0,58 mg/ml
#77-22	0,75 mg/ml

Tabla 3

Niveles de anticuerpo scFv-Fc en sangre en G2 de #103	
Nº de Id. del individuo	Nivel de anticuerpo en sangre
#103-3	0,35 mg/ml
# 103-8	0,42 mg/ml
#103-16	0,38 mg/ml

Tabla 4

Niveles de anticuerpo scFv-Fc en huevos puestos por G2 de #77		
Nº de Id. del individuo	Nivel del anticuerpo en la clara de huevo	Nivel del anticuerpo en la yema de huevo
#77-12	0,57 mg/ml	0,33 mg/ml

- 5 Aunque el G1 #77 mostraba un nivel de anticuerpo en sangre de 0,5 a 0,8 mg/ml, los polluelos G2 nacidos como resultado de su apareamiento con un tipo silvestre mostraban casi los mismos niveles de anticuerpo en sangre, como se muestra en la Tabla 2. Aunque el G1 #103 mostraba un nivel de anticuerpo en sangre de 0,3 a 0,5 mg/ml, los polluelos G2 nacidos como resultado de su apareamiento con un tipo silvestre mostraban casi los mismos niveles de anticuerpo en sangre, como se muestra en la Tabla 3. Además, en el caso del G2 hembra de #77 que dio un nivel de expresión de anticuerpo promedio en la clara de huevo de 0,3 mg/ml, el anticuerpo se expresó en la clara de huevo en sus huevos a casi los mismos niveles, como se muestra en la Tabla 4.

10 Estos resultados demostraron que la gallina transgénica de la invención no experimentará silenciamiento génico ni siquiera a través de una serie de generaciones y, cuando se usa un mayor número de descendientes producidos a partir de esa transgénica mediante apareamiento, pueden aplicarse como una fábrica de producción de proteínas de bajo coste.

#### 15 APLICABILIDAD INDUSTRIAL

El ave transgénica G1 y su descendencia pueden expresar eficazmente y sin inactivación un gen extraño introducido por medio de un vector retroviral de replicación deficiente altamente seguro.

- 20 El ave transgénica G1 porta el transgén en todas las células somáticas, permite la expresión de proteínas estables a nivel del individuo y, como línea establecida, puede convertirse en una fuente de proteínas estable.

Además, el método para construir aves transgénicas de acuerdo con la invención hace posible construir de forma segura y eficaz aves transgénicas G1 y, además, aves transgénicas G2 y G3 como su descendencia.

- 25 Las aves transgénicas G1, G2, G3 y de generaciones posteriores expresan una proteína debida a un gen extraño en células somáticas y, cuando la proteína se recupera y se purifica del suero, clara de huevo y/o yema de huevo, puede proporcionarse un sistema de producción económico para proteínas, que hasta la fecha han sido difíciles de producir, o anticuerpos que portan cadenas glucídicas.

#### LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Kaneka Corporation
- <120> AVE TRANSGÉNICA Y MÉTODO PARA CONSTRUIRLA
- 30 <130> B030497W001
- <150> JP 2004-003045
- <151> 8-1-2004
- <160> 18
- <210> 1
- 35 <211> 28

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diseñada de un cebador 5' que incorpora el sitio de reconocimiento de Sall en el extremo 5' usado para amplificación por PCR del fragmento promotor de b-actina de gallina que carece de intrón  
 5 <400> 1  
 acgcgctgcac gtgcatgcac gctcattg 28  
 <210> 2  
 <211> 26  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia diseñada de un cebador 3' que incorpora el sitio de reconocimiento de Sall en el extremo 5' usado para amplificación por PCR del fragmento promotor de b-actina de gallina que carece de intrón  
 15 <400> 2  
 acgcgctgcac aacgcagcga ctcccc 26  
 <210> 3  
 <211> 61  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido diseñado que actúa como cadena sentido en la hibridación para construir el fragmento codificante de la señal de secreción de lisozima de gallina  
 <400> 3  
 ctagaccatg aggtctttgc taatctttggt gctttgcttc ctgccctgg ctgctctggg 60  
 g 61  
 25 <210> 4  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido diseñado que actúa como cadena anti-sentido en la hibridación para construir el fragmento codificante de la señal de secreción de lisozima de gallina  
 <400> 4  
 cccagagca gccaggggca ggaagcaaag caccaagatt agcaaagacc tcatggt 57  
 35 <210> 5  
 <211> 26

- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 5 <223> Secuencia diseñada de un cebador 5' que incorpora el sitio de reconocimiento de Dra I en el extremo 5' usado para amplificación por PCR del fragmento codificante de scFv
- <400> 5
- gcgtttaaag tgacgttgga cgtccg 26
- <210> 6
- <211> 29
- 10 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia diseñada de un cebador 3' que incorpora el sitio de reconocimiento de BamH I en el extremo 5' usado para amplificación por PCR del fragmento codificante de scFv
- 15 <400> 6
- attagatcc gcgcttaagg acggtcagg 29
- <210> 7
- <211> 18
- <212> ADN
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia diseñada de un cebador 5' usado para amplificación por PCR del fragmento codificante de la región constante de cadena pesada  $\gamma$ 1 de anticuerpo humano
- <400> 7
- 25 caagcttcaa gggcccat 18
- <210> 8
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <223> Secuencia diseñada de un cebador 3' usado para amplificación por PCR del fragmento codificante de la región constante de cadena pesada  $\gamma$ 1 de anticuerpo humano
- <400> 8
- atttaccggg agacagga 19
- 35 <210> 9
- <211> 35
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

## ES 2 380 804 T3

- <220>
- <223> Secuencia diseñada de un cebador 5' que incorpora el sitio de reconocimiento de BamH I en el extremo 5' usado para amplificación por PCR del fragmento codificante de la región Fc de cadena pesada  $\gamma$ 1 de anticuerpo humano
- 5 <400> 9  
attagatcc gagcccaaat cttgtgacaa aactc 35  
<210> 10  
<211> 30  
<212> ADN
- 10 <213> Secuencia artificial  
<220>
- <223> Secuencia diseñada de un cebador 3' que incorpora el sitio de reconocimiento de Hind III en el extremo 5' usado para amplificación por PCR del fragmento codificante de la región Fc de cadena pesada  $\gamma$ 1 de anticuerpo humano
- 15 <400> 10  
agcaagcttt catttaccg gagacagga 30  
<210> 11  
<211> 30  
<212> ADN
- 20 <213> Secuencia artificial  
<220>
- <223> Secuencia diseñada de un cebador 5' usado para amplificación por PCR de un fragmento de 393 pb en el gen de scFv
- <400> 11
- 25 gtcttattag cgggtctggt agtagcacia 30  
<210> 12  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <223> Secuencia diseñada de un cebador 3' usado para amplificación por PCR de un fragmento de 393 pb en el gen de scFv
- <400> 12  
gagacttctg ctggtaccag ccata 25
- 35 <210> 13  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>

## ES 2 380 804 T3

- <223> Secuencia diseñada de un cebador 5' usado para amplificación por PCR de un fragmento de 311 pb en el gen de GFP
- <400> 13
- agctcaccct gaaattcatc tgcaccactg            30
- 5    <210> 14
- <211> 30
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10   <223> Secuencia diseñada de un cebador 3' usado para amplificación por PCR de un fragmento de 311 pb en el gen de GFP
- <400> 14
- gttgtattcc agctgtggc cgagaatgtt            30
- <210> 15
- 15   <211> 27
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20   <223> Secuencia diseñada de un cebador 5' usado para amplificación por PCR de un fragmento de 355 pb en el gen de GFP
- <400> 15
- caacactggt cactaccttc acctatg            27
- <210> 16
- <211> 25
- 25   <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia diseñada de un cebador 3' usado para amplificación por PCR de un fragmento de 355 pb en el gen de GFP
- 30   <400> 16
- acggatccat cctcaatgtt gtgtc            25
- <210> 17
- <211> 26
- <212> ADN
- 35   <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia diseñada de un cebador 5' usado para amplificación por PCR de un fragmento de 317 pb en el gen de ovoalbúmina
- <400> 17

## ES 2 380 804 T3

cgcttgata aactccagg attcgg 26  
<210> 18  
<211> 27  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Secuencia diseñada de un cebador 3' usado para amplificación por PCR de un fragmento de 317 pb en el gen de ovoalbúmina  
<400>18  
10 catctagctg tcttgctaa gcgtaca 27

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para construir un ave transgénica G1 que comprende:
  - a) incubar un huevo de ave fertilizado,
  - 5 b) microinyectar en el corazón de su embrión temprano después de la fase blastodérmica, cuando el embrión temprano está al menos 48 horas después del comienzo de la incubación, un vector retroviral de replicación deficiente que contiene un gen obtenido no de retrovirus que codifica un anticuerpo,
  - c) dejar que el huevo eclosiona para obtener, de este modo, un ave quimérica transgénica G0, y
  - d) aparear a un ave quimérica transgénica G0 macho con un ave hembra de tipo silvestre.
- 10 2. El método para construir un ave transgénica de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ave es una gallina o una codorniz.
3. El método para construir un ave transgénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, que comprende microinyectar un vector retroviral de replicación deficiente que tiene un valor cuantitativo no inferior a  $1 \times 10^7$  ufc/ml.
- 15 4. El método para construir un ave transgénica de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende microinyectar un vector retroviral de replicación deficiente que tiene un valor cuantitativo no inferior a  $1 \times 10^9$  ufc/ml.
5. El método para construir un ave transgénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el vector retroviral de replicación deficiente es un vector obtenido de virus de la leucemia murina de Moloney.
6. El método para construir un ave transgénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el vector retroviral de replicación deficiente es pseudotipado como VSV-G.
- 20 7. El método para construir un ave transgénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el gen obtenido no de retrovirus está bajo el control del promotor de  $\beta$ -actina de gallina.
8. El método para construir un ave transgénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
- 25 9. El método para construir un ave transgénica de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el anticuerpo quimérico es un anticuerpo scFv-Fc.

Fig. 1

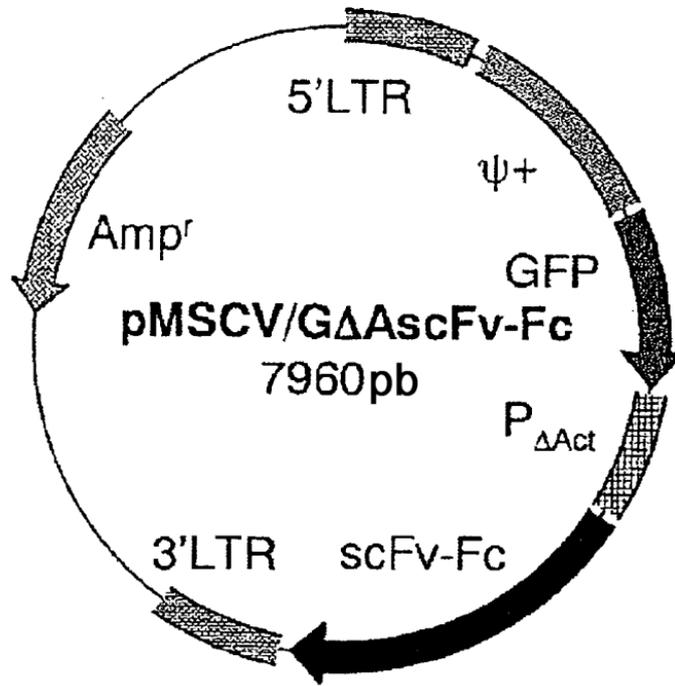
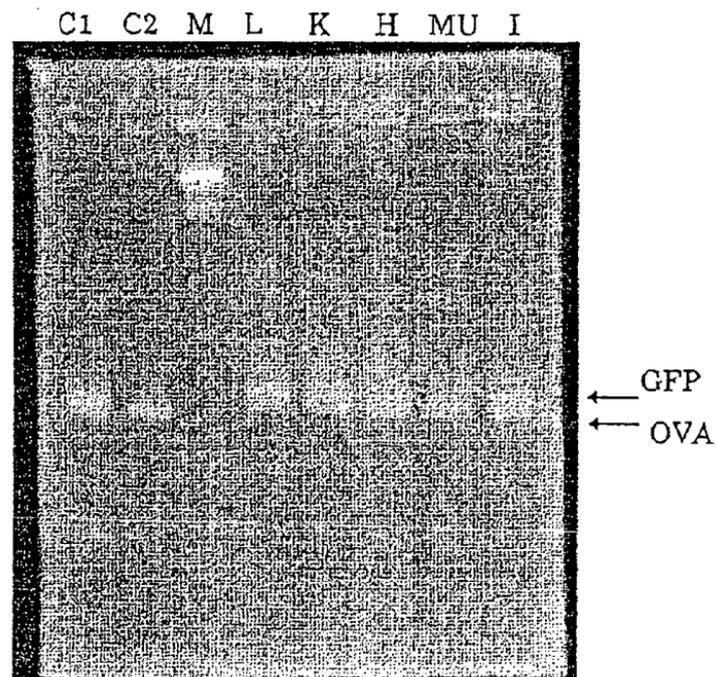
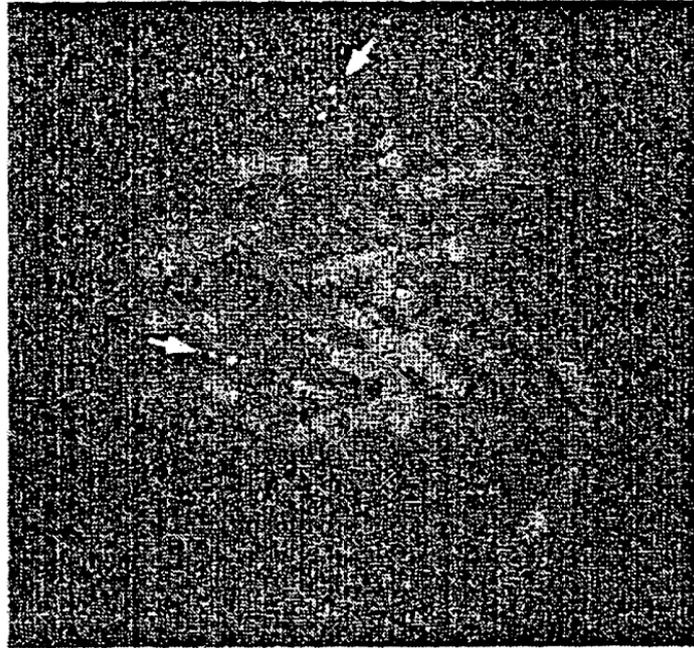


Fig. 2



Análisis FISH de #77



Análisis FISH de #103

