

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 792**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/13** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

**A01K 67/027** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2003 E 03788072 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **29.06.2005 EP 1548114**

54 Título: **Método de expresión de un gen en aves transgénicas usando vector de retrovirus y aves transgénicas así obtenidas**

30 Prioridad:

**13.08.2002 JP 2002236089**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**05.02.2013**

73 Titular/es:

**KANEKA CORPORATION (50.0%)  
2-4, Nakanoshima 3-chome Kita-ku  
Osaka-shi, Osaka 530-8288, JP y  
NAGOYA INDUSTRIAL SCIENCE RESEARCH  
INSTITUTE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**IJIMA, SHINJI;  
KAMIHIRA, MASAMICHI;  
NISHIJIMA, KENICHI y  
ONO, KENICHIRO**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 394 792 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 expresión de un gen en aves transgénicas usando vector de retrovirus y aves transgénicas así obtenidas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un ave quimérica transgénica G0 que produce un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo scFv-Fc, en sangre y huevos. Además, la invención se refiere a un método de producción de un anticuerpo que comprende producir un ave quimérica transgénica G0 en la que se introduce un gen de anticuerpo exógeno con un vector de retrovirus de replicación defectuosa, y recuperar un anticuerpo producido en sangre, clara de huevo o yema de huevo. Además, la presente invención también se refiere a un método de producción de un ave quimérica transgénica G0 que expresa eficazmente un transgén, y al ave quimérica transgénica G0 que puede obtenerse mediante dicho método de producción.

15 **Antecedentes de la técnica**

Como medio de investigación de las funciones de genes, se han realizado activamente investigaciones sobre animales transgénicos en los que se incorpora un gen exógeno en el huésped. Estos animales transgénicos son útiles no sólo en investigación fundamental, sino también en aplicaciones industriales tales como mejora de razas, producción de sustancias y donantes para órganos de sustitución. Un intento de hacer que la leche de vacas, cabras, ovejas, etc. produzca una sustancia biológicamente activa se ha aproximado a un uso práctico. Como ejemplos típicos del mismo,  $\alpha$ 1-antitripsina y antitrombina están ahora en fase clínica con el objetivo de lograr aplicaciones en productos farmacéuticos.

Las aves de corral, normalmente codornices y pollos, se han criado desde hace mucho tiempo para obtener carne y los huevos que ponen, por tanto también son presumibles diversos enfoques referentes a la mejora de razas tales como tolerancia a enfermedades y mejoras en la carne con el objetivo de investigación transgénica. Además, puesto que las aves requieren un corto periodo para alcanzar la madurez sexual y pueden criarse en espacios pequeños, se cree que son sistemas de expresión de proteínas de bajo coste y se espera que su producción transgénica sea un medio de producción de productos farmacéuticos de anticuerpos y proteínas raras. Puesto que los huevos de las aves contienen una gran cantidad de proteína y se ponen cada día, se cree que pueden convertirse en un sistema de producción eficaz si un producto transgénico puede producirse sistemáticamente como una proteína recombinante en huevos.

En cuanto a los anticuerpos monoclonales, que se han comercializado en muchos artículos y han atraído atención como productos farmacéuticos en los últimos años, la difusión en el mercado de los mismos se ha visto impedida puesto que no pueden producirse en un sistema de expresión barato tal como *Escherichia coli*, y el valor unitario de los mismos es caro. Mientras tanto, las células de aves tienen funciones para constituir una proteína de anticuerpo, y puede esperarse que aves transgénicas sean medios de producción de un anticuerpo para aplicaciones médicas, etc., que han sido convencionalmente difíciles de producirse en masa. Además, se cree que estos productos de proteína tienen una alta posibilidad de tener características ventajosas para aplicaciones en medicina y como agente de pruebas tales como estabilidad mejorada en sangre ya que las células de aves les proporcionan una cadena de azúcar.

Tal como se describió anteriormente, se espera que aves transgénicas sean útiles para aplicaciones tales como medios de producción de proteínas útiles, aunque por otro lado, independientemente de los diversos intentos que se han realizado hasta la fecha, no se ha encontrado aún ningún caso en el que se acumule de manera satisfactoria una proteína recombinante prevista en un huevo de ave a un nivel práctico. Además, no se ha encontrado aún ningún caso en el que se produzcan satisfactoriamente aves transgénicas que expresan una proteína que tiene una conformación que comprende una pluralidad de unidades tal como un anticuerpo a alta concentración.

Harvey *et al.* (Harvey, A. J *et al.* (2002) Nature Biotechnology. 19, 396) produjeron un pollo quimérico transgénico G0 usando un vector derivado del virus de la leucosis aviar e introduciendo el gen de  $\beta$ -lactamasa en un pollo, pero la cantidad de expresión de enzima en suero o huevo era como máximo de aproximadamente 50 a 250 ng/ml. Pollos quiméricos transgénicos G1 a G3 producidos apareando los pollos quiméricos transgénicos G0 aumentaron la cantidad de expresión de enzima introduciendo genes en células somáticas completas, pero el aumento del nivel sigue siendo de como máximo varios  $\mu$ g/ml, por tanto están lejos todavía de una aplicación práctica.

Generalmente, para producir un animal transgénico, se usa un método que comprende microinyectar ADN en un pronúcleo de un huevo fértil, pero este método no puede aplicarse a aves. Esto se debe a que es difícil obtener un embrión en la fase de una célula, e incluso si puede obtenerse, no existe tecnología para distinguir el núcleo en el huevo. Para obtener el embrión en la fase de una célula, es necesario obtener un huevo inmediatamente tras la fertilización a partir de un oviducto de un ave hembra, y desarrollar el huevo de manera normal. En los últimos años, Perry estableció un sistema para obtener una célula preescindida de gallina y cultivar la célula fuera del cuerpo (Perry, M. M (1988) Nature, 331). Sin embargo, incluso con esta tecnología, es imposible distinguir el núcleo dentro del huevo e introducir un gen previsto en el núcleo.

Por tanto, la introducción de un gen en un huevo fértil de ave se ha restringido a la inyección de ADN en el citoplasma, y se han intentado el uso de una bicapa lipídica con inclusión de ADN (liposoma), un método de fosfato de calcio o un método de electroporación. Sin embargo, con estas tecnologías, la introducción eficaz del gen es escasa, y la posibilidad de que el ADN de plásmido introducido se introduzca en un cromosoma es baja. Aunque el método de introducción del gen mediante microinyección puede transferir eficazmente un ADN previsto a un huevo fértil, puesto que el ADN de plásmido introducido no se incorpora en un cromosoma del huésped, el plásmido del transgén se omite acompañado por la división de células somáticas del huésped, por tanto, no puede obtenerse el efecto de introducción estable del gen.

En 1986, se notificó por primera vez un ejemplo de producción de un pollo transgénico usando un vector de retrovirus (Salter, D. W *et al.* (1986) *Poultry Sci.*, 65). La tecnología de inyección de un vector de retrovirus en un huevo fértil mediante el método de microinyección es una tecnología altamente eficaz en la introducción del gen, y para las aves a las que no puede inyectarse ADN directamente en el núcleo, es el único método práctico para producir animales transgénicos en los que se inserta un gen previsto en el cromosoma.

Los presentes inventores han realizado investigaciones intensas y, como resultado, encontraron un método de producción de un ave transgénica que comprende usar un vector de virus de replicación defectuosa seguro que se aplica también para terapia génica, e introducir eficazmente un gen previsto (publicación denominada "kokaï" de solicitud de patente japonesa 2002-176880). Mediante este método, se hizo posible producir de manera segura y eficaz un ave transgénica que tenía una pluralidad de copias del transgén. Además, también se encontró que el transgén se transmite a la siguiente generación con alta eficacia mediante esta tecnología, y el uso de un ave transgénica como sistema de producción de sustancias se ha aproximado a un uso práctico.

Sin embargo, puesto que la mayoría de los genes introducidos en este momento se inactivan por el huésped (denominado silenciamiento génico) en la fase temprana de desarrollo, la cantidad de producción de proteína como resultado de expresión génica era muy pequeña. Aunque el mecanismo biológico de la inactivación de transgenes no se ha clarificado aún, es indispensable una tecnología de prevención de esta inactivación y de expresión eficaz de un gen previsto para la aplicación de desarrollo de un ave transgénica.

### 30 Sumario de la invención

Para especificar el momento del gen, que se ha introducido en un huevo fértil usando un vector de retrovirus, que se inactiva tras la generación, los presentes inventores estudiaron cómo cambia la cantidad de expresión introduciendo un vector en diversas fases tras la fertilización usando un gen de expresión de  $\beta$ -galactosidasa como indicador. Como resultado, encontraron que la cantidad de expresión del transgén cambia significativamente dependiendo del momento en el que dicho gen se introduce durante el desarrollo del embrión. Por tanto, se ha completado la invención. Es decir, la inactivación del transgén está de manera notable en relación con el gen introducido inmediatamente tras el desove, y la frecuencia de expresión del gen introducido tras el transcurso de un determinado periodo de tiempo tras el desove es alta.

Los presentes inventores usaron este descubrimiento, y encontraron que si se introduce un gen exógeno en un embrión temprano tras el transcurso de un tiempo específico desde el inicio de la incubación, que depende de la especie de ave, se hace posible expresar eficazmente un gen previsto sin la influencia de la inactivación por el huésped.

Además, cuando los inventores produjeron un vector en el que se incorpora un gen que codifica para un anticuerpo quimérico útil como productos farmacéuticos, por ejemplo un scFv-Fc (anticuerpo de cadena sencilla), e introdujeron el vector en una codorniz para producir un ave quimérica transgénica G0 mediante este método, se encontró que se expresa un anticuerpo derivado del transgén a alta concentración en sangre, clara de huevo y yema de huevo.

Es decir, el primer aspecto de la presente invención se refiere a un método de producción de un ave quimérica transgénica G0 que comprende incubar un huevo fértil de ave, infectar un embrión temprano después y de manera exclusiva de un periodo blastodérmico inmediatamente tras el desove (fase X) con un vector de retrovirus de replicación defectuosa, y entonces hacer eclosionar el embrión, y a un ave quimérica transgénica G0 producida mediante dicho método.

El segundo aspecto de la presente invención se refiere a un ave quimérica transgénica G0 en la que se introduce un gen de anticuerpo exógeno con un vector de retrovirus de replicación defectuosa, y produce un anticuerpo derivado de un transgén en al menos uno de sangre, clara de huevo y yema de huevo.

El tercer aspecto de la presente invención se refiere a un método de producción de un anticuerpo que comprende producir el ave quimérica transgénica G0, y recuperar el anticuerpo de la sangre y/o un huevo de dicha ave quimérica transgénica G0.

Se confirmó que la expresión de un transgén por el ave quimérica transgénica G0 de la presente invención se mantiene incluso cuando el ave quimérica transgénica G0 crece hasta dar un ave adulta. Por tanto, mediante la

invención, se hace posible construir un sistema de producción práctico que comprende introducir un gen específico en un ave, y producir una proteína prevista incluso tras crecer. Además, el transgén del ave quimérica transgénica G0 producida mediante la invención se transmite a la siguiente generación a alta eficacia de transmisión mediante apareamiento. Puesto que el transgén se transmite a la siguiente generación en forma incorporada en el cromosoma, el sistema de producción mediante un ave transgénica puede proporcionar una producción de sustancias estable.

Mediante la invención, la proteína prevista producida en una célula somática del ave transgénica se secreta en la sangre, y puede usarse mediante separación del suero.

Además, los inventores también encontraron que un anticuerpo que tiene la región constante que pertenece a la clase de IgG humana y un anticuerpo que tiene la región constante de IgG de codorniz, IgG de pollo o IgG de ratón se transmite eficazmente de la sangre a los huevos en codornices y pollos. Cuando el anticuerpo que tiene estas regiones constantes se expresa en el ave quimérica transgénica G0 producida mediante el método de la invención, el anticuerpo secretado en la sangre se acumula a una alta concentración en huevos.

Cuando la proteína prevista se adquiere introduciendo un gen en animales transgénicos, en mamíferos, la proteína se secreta generalmente en la leche y se recupera, pero en un ave transgénica, un objeto se acumula en los huevos, y se recupera y purifica de la clara y la yema de huevo de los mismos.

En huevos de gallina y similares, el 30% del componente completo es proteína, y la proteína que se produce como componente principal es ovoalbúmina. Convencionalmente, como método para expresar una proteína recombinante en huevos de aves transgénicas, se ha adoptado un método de uso de un promotor de expresión de ovoalbúmina y similares, incorporando un gen que codifica para una proteína prevista en el sentido de 3', y expresando un objeto en la clara de huevo en lugar de ovoalbúmina.

Sin embargo, en el método de la invención, se hace posible provocar la secreción de un anticuerpo expresado en una gran cantidad, por ejemplo dicho anticuerpo de la clase IgG, etc. bajo el control de un promotor constitutivo, por ejemplo el promotor de  $\beta$ -actina de pollo, etc. en sangre para la acumulación del mismo en huevos. En esta descripción, el promotor constitutivo se refiere a un promotor expresado de manera sistémica.

Además, para especificar la parte esencial para su transición a huevos entre las estructuras de anticuerpos, se inocularon anticuerpos modificados, fragmentos Fab y Fc, en sangre de codorniz y pollo para someter a prueba la capacidad de transición a huevos. Como resultado, se acumuló un fragmento Fc en huevos, y se sugirió que la transición de anticuerpos a huevos se lleva a cabo a través del receptor Fc.

A partir de este descubrimiento, como método para usar universalmente el método de producción de un anticuerpo por un ave transgénica en huevos como método de producción general de proteína, es presumible un método de producción que comprende diseñar un vector que produce una proteína que tiene la estructura de la región constante de IgG humana (Fc) que se fusiona, producir un ave transgénica, recuperar una proteína que contiene un objeto de los huevos y cortar la parte Fc para purificar el objeto.

Además, convencionalmente, cuando se produjo un anticuerpo usando un animal transgénico mamífero, se ha indicado el problema de la dificultad de separar y purificar el autoanticuerpo que se produce en el animal de producción y un anticuerpo previsto. Como ventaja del método de producción de anticuerpos usando un ave como animal de producción, puede mencionarse la facilidad de separación del autoanticuerpo del ave y el anticuerpo recombinante previsto puesto que el autoanticuerpo no se absorbe sobre columnas de proteína A y proteína G.

Tal como se mencionó anteriormente, aunque un anticuerpo monoclonal humano es útil como producto farmacéutico, existe sólo un medio de producción caro que usa un cultivo de células animales o fluido ascítico de ratón, y su alto valor unitario impide la difusión en el mercado del mismo.

En los últimos años, se ha producido un scFv (anticuerpo de cadena sencilla) en el que sólo regiones V de cadena H y cadena L del anticuerpo están unidas con una secuencia ligadora mediante técnicas de ingeniería genética, y esto tiene la ventaja de poder producirse por *Escherichia coli* de modo que atrae atención en vista de los costes. Sin embargo, estas proteínas denominadas anticuerpos de bajo peso molecular tienen poca estabilidad en sangre, por tanto son difíciles de utilizar de manera práctica para usos terapéuticos y de pruebas.

Aunque un scFv-Fc, que puede producirse uniendo una región Fc a un scFv, es estable también en sangre y se considera que es más práctico, no puede producirse por *Escherichia coli*, y puede suministrarse sólo mediante un biorreactor usando una célula animal. Un scFv-Fc humanizado, que puede producirse uniendo un Fc humano al scFv que tiene una región de unión producida por otro animal tal como pollo, es prometedor también para usos terapéuticos. Cuando esta proteína puede producirse en masa por el ave quimérica transgénica G0 de la invención, su disponibilidad es alta.

El ave quimérica transgénica G0 de la invención puede aplicarse a la producción en masa de la proteína de anticuerpo que puede producirse sólo en una pequeña cantidad de la manera convencional, es decir, un anticuerpo recombinante tal como un scFv-Fc, anticuerpo quimérico, anticuerpo monoclonal humano, etc. a bajo coste, y el uso del mismo mediante recuperación y purificación de manera práctica.

Por tanto, en la presente invención, se da a conocer un método de producción de un transgén que se expresa eficazmente en el ave quimérica transgénica G0 usando un vector de retrovirus. También se da a conocer en la invención un método de producción de un ave quimérica transgénica G0 que produce una proteína útil prevista en células somáticas del ave introduciendo un gen específico. Además se da a conocer en la invención un sistema de producción de proteína de bajo coste de producción que comprende hacer que las células del ave produzcan sustancias útiles como productos farmacéuticos y de pruebas tales como un anticuerpo de tipo humano monoclonal, anticuerpo quimérico, anticuerpo scFv-Fc y proteína funcional que tiene una conformación complicada, que no puede producirse convencionalmente por *Escherichia coli*, etc., y la utilización de la misma mediante recuperación del suero y la sangre.

Además, también es presumible proporcionar una tecnología de modificación de aves domésticas de un modo preferible aplicando el método de producción de un ave quimérica transgénica G0 de la presente invención y un ave modificada. Como características de las aves domésticas, se prefieren una calidad de la carne mejorada, resistencia a enfermedades mejorada, tasa de crecimiento mejorada y similares. También se demandan aves como mascotas, y el método de producción de la invención también puede aplicarse como medio para la mejora de razas con características preferibles para mascotas tales como mejora en los colores de las plumas y disminución en la agresividad en un corto periodo.

Además, habitualmente, la producción transgénica de mamíferos, anfibios, peces y similares se lleva a cabo actualmente mediante una transferencia nuclear, pero la invención también puede aplicarse como nueva tecnología eficaz alternativa de producción de animales transgénicos.

Es decir, la presente invención se refiere a un ave quimérica transgénica G0 en la que se introduce un gen de anticuerpo exógeno con un vector de retrovirus de replicación defectuosa, y produce un anticuerpo derivado de un transgén en al menos uno de sangre, clara de huevo y yema de huevo. La región constante del anticuerpo anterior es preferiblemente una clase que pertenece a IgG humana, una subclase que pertenece a IgG1 humana, IgG de codorniz, IgG de pollo o IgG de ratón. El gen de anticuerpo anterior se controla preferiblemente mediante un promotor constitutivo, y el promotor constitutivo anterior es preferiblemente el promotor de  $\beta$ -actina de pollo. El vector de retrovirus anterior es preferiblemente un vector derivado del virus de la leucemia murina de Moloney, y se prefiere un virus de pseudotipo VSV-G. El ave quimérica transgénica G0 de la invención es preferiblemente un pollo o una codorniz. El anticuerpo anterior es preferiblemente un anticuerpo quimérico, y la cantidad de producción del anticuerpo quimérico anterior es preferiblemente no inferior a 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , más preferiblemente no inferior a 5  $\mu\text{g/ml}$  en sangre. En clara de huevo, es preferiblemente no inferior a 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , más preferiblemente no inferior a 1  $\mu\text{g/ml}$ , y en yema de huevo, es preferiblemente no inferior a 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , más preferiblemente no inferior a 1  $\mu\text{g/ml}$ . El anticuerpo anterior es preferiblemente un anticuerpo scFv-Fc, y la cantidad de producción de dicho anticuerpo scFv-Fc es preferiblemente no inferior a 20  $\mu\text{g/ml}$ , más preferiblemente no inferior a 2000  $\mu\text{g/ml}$  en sangre. En clara de huevo, es preferiblemente no inferior a 5  $\mu\text{g/ml}$ , más preferiblemente no inferior a 500  $\mu\text{g/ml}$ , y en yema de huevo, es preferiblemente no inferior a 5  $\mu\text{g/ml}$ , más preferiblemente no inferior a 500  $\mu\text{g/ml}$ . Un método de producción de un anticuerpo que comprende producir el ave quimérica transgénica G0 de la invención, y recuperar el anticuerpo de la sangre y/o los huevos de dicha ave quimérica transgénica G0 es también un aspecto de la invención.

Un método de producción de un ave quimérica transgénica G0 que comprende incubar un huevo fértil de ave, infectar un embrión temprano después y de manera exclusiva de un periodo blastodérmico inmediatamente tras el desove con un vector de retrovirus de replicación defectuosa, y entonces hacer eclosionar el embrión es también un aspecto de la invención. En el método de producción de un ave quimérica transgénica G0 de la invención, el momento de infección de un vector de retrovirus de replicación defectuosa es preferiblemente tras 24 horas o más desde el inicio de la incubación. El método de infección de un vector de retrovirus de replicación defectuosa comprende preferiblemente un embrión temprano en el que se microinyecta el vector en el corazón o un vaso sanguíneo formado en un embrión temprano. El corazón o vaso sanguíneo anterior se forma preferiblemente en el embrión temprano tras 24 horas o más desde el inicio de la incubación. En cuanto a la actividad del vector de retrovirus de replicación defectuosa que va a microinyectarse, el vector tiene preferiblemente el título de no menos de  $1 \times 10^7$  ufc/ml, más preferiblemente no menos de  $1 \times 10^8$  ufc/ml, y todavía más preferiblemente no menos de  $1 \times 10^9$  ufc/ml. El vector de retrovirus anterior es preferiblemente un vector derivado del virus de la leucemia murina de Moloney, y se prefiere un virus de pseudotipo VSV-G. El ave quimérica transgénica G0 producida mediante la invención es preferiblemente un pollo o una codorniz. El transgén incorporado en el vector de retrovirus de replicación defectuosa anterior contiene preferiblemente una secuencia génica no derivada de un retrovirus. La secuencia génica anterior no derivada de un retrovirus es preferiblemente una secuencia génica controlada por el promotor de  $\beta$ -actina de pollo, y es preferiblemente una secuencia génica que codifica para un gen de anticuerpo o gen de proteína de fusión. El gen de anticuerpo anterior es preferiblemente un gen de anticuerpo quimérico, y se prefiere un gen de anticuerpo scFv-Fc.

El ave quimérica transgénica G0 producida mediante el método de producción de un ave quimérica transgénica G0 de la invención es también un aspecto de la presente invención.

### Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1 muestra la estructura del constructo de vector pMSCVN $\Delta$ A $\beta$  de un vector de retrovirus de replicación defectuosa. Neo<sup>r</sup> representa un gen de resistencia a neomicina y Amp<sup>r</sup> representa un gen de resistencia a ampicilina. P <sub>$\Delta$ Act</sub> representa un gen de promotor de  $\beta$ -actina.  $\beta$ -Gal representa un gen de expresión de  $\beta$ -galactosidasa.  $\Psi$ + representa una secuencia de señal de empaquetamiento. 5'LTR y 3'LTR representa cada uno una secuencia de repetición terminal larga de MoMLV.
- 10 La figura 2 muestra la relación entre el momento de introducción de un gen y la expresión de actividad  $\beta$ -galactosidasa en una codorniz quimérica transgénica G0. El eje horizontal muestra el tiempo de incubación (h), y el eje vertical muestra la actividad  $\beta$ -galactosidasa expresada en mUnidades/mg.
- 15 La figura 3 muestra la relación entre el momento de introducción de un gen y la expresión de actividad  $\beta$ -galactosidasa en un pollo quimérico transgénico G0. El eje horizontal muestra el tiempo de incubación (h), y el eje vertical muestra la actividad  $\beta$ -galactosidasa expresada en mUnidades/mg.
- 20 La figura 4 muestra la relación entre el título del vector de retrovirus introducido y la expresión de actividad  $\beta$ -galactosidasa en una codorniz quimérica transgénica G0. El eje horizontal muestra el título del virus expresado en ufc/ml, y el eje vertical muestra la actividad  $\beta$ -galactosidasa expresada en mUnidades/mg.
- 25 La figura 5 muestra la relación entre el título del vector de retrovirus introducido y la expresión de actividad  $\beta$ -galactosidasa en una codorniz quimérica transgénica G0. El eje horizontal muestra el título del virus expresado en ufc/ml, y el eje vertical muestra la actividad  $\beta$ -galactosidasa expresada en mUnidades/mg.
- 30 La figura 6 muestra el anticuerpo de IgG humana acumulado en huevos de codorniz. El valor del anticuerpo muestra el valor promedio del resultado del mismo experimento llevado a cabo con tres codornices.
- 35 La figura 7 muestra el anticuerpo de IgG humana acumulado en huevos de pollo. El valor del anticuerpo muestra el valor promedio del resultado del mismo experimento llevado a cabo con tres pollos.
- La figura 8 muestra el fragmento Fab acumulado en huevos de codorniz. El valor del anticuerpo muestra el valor promedio del resultado del mismo experimento llevado a cabo con tres codornices.
- 40 La figura 9 muestra el fragmento Fab acumulado en huevos de pollo. El valor del anticuerpo muestra el valor promedio del resultado del mismo experimento llevado a cabo con tres pollos.
- 45 La figura 10 muestra el fragmento Fc acumulado en huevos de codorniz. El valor del anticuerpo muestra el valor promedio del resultado del mismo experimento llevado a cabo con tres codornices.
- 50 La figura 11 muestra el fragmento Fc acumulado en huevos de pollo. El valor del anticuerpo muestra el valor promedio del resultado del mismo experimento llevado a cabo con tres pollos.
- La figura 12 muestra las estructuras de los constructos de vector de expresión de anticuerpo anti-CD2 pMSCV/G $\Delta$ AL (figura 12(A)), pMSCV/G $\Delta$ AH (figura 12(B)) y pMSCV/G $\Delta$ ALIH (figura 12(C)). Amp<sup>r</sup> representa un gen de resistencia a ampicilina. P $\Delta$ Act representa un gen de promotor de  $\beta$ -actina.  $\Psi$ + representa una secuencia de señal de empaquetamiento. GFP representa un gen de proteína fluorescente verde. L representa un gen de cadena ligera de anticuerpo anti-CD2. H representa un gen de cadena pesada de anticuerpo anti-CD2. 5'LTR y 3'LTR representan cada uno una secuencia de repetición terminal larga de MoMLV.
- 55 La figura 13 muestra la estructura del constructo de vector de expresión de anticuerpo scFv-Fc pMSCV/G $\Delta$ AscFv-Fc. Amp<sup>r</sup> representa un gen de resistencia a ampicilina. P $\Delta$ Act representa un gen de promotor de  $\beta$ -actina.  $\Psi$ + representa una secuencia de señal de empaquetamiento. GFP representa un gen de proteína fluorescente verde. scFv-Fc representa un gen de anticuerpo scFv-Fc. 5'LTR y 3'LTR representan cada uno una secuencia de repetición terminal larga de MoMLV.
- 60 La figura 14 muestra la cantidad de scFv-Fc expresada en suero de codorniz quimérica transgénica G0. El eje horizontal muestra el número de individuo, y el eje vertical muestra la concentración de un anticuerpo scFv-Fc ( $\mu$ g/ml).
- 65 La figura 15 muestra la cantidad de un scFv-Fc expresada en huevos de codorniz quimérica transgénica G0. El eje horizontal muestra la fecha de recogida del huevo desde el inicio del desove, y el eje vertical muestra la concentración de un anticuerpo scFv-Fc ( $\mu$ g/ml).

La figura 16 muestra el resultado del análisis de scFv-Fc purificado mediante SDS-PAGE. El carril 1 muestra el marcador de bajo peso molecular (LMW), y el carril 4 muestra el marcador de alto peso molecular (HMW). El carril 2 y el carril 3 muestran los resultados de la electroforesis de un scFv-Fc sometido a tratamiento de reducción y un scFv-Fc que no se somete a tratamiento de reducción, respectivamente.

5

### Descripción detallada de la invención

A continuación en el presente documento, se describe la presente invención en detalle.

10 El ave quimérica transgénica G0 de la invención es el ave en la que se introduce un gen de anticuerpo exógeno con un vector de retrovirus de replicación defectuosa, y produce un anticuerpo derivado de un transgén en sangre, clara de huevo o yema de huevo.

15 El ave que va a usarse en la práctica de la invención no está particularmente restringida y, por ejemplo, pueden mencionarse aves domésticas domesticadas para alimentación, desove y fines similares tales como un pollo, pavo, pato, avestruz y codorniz, y aves de mascota. Entre ellas, se prefieren un pollo y una codorniz en vista de la fácil disponibilidad y fertilidad como especies de producción de huevos.

20 Como vector de retrovirus que va a usarse en la invención, pueden mencionarse vectores derivados del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), virus de la leucosis aviar (VLA) y similares. Entre ellos, se prefieren los derivados de MoMLV, aunque la invención no se limita a estos.

25 En consideración de la seguridad, el virus generalmente usado como vector transgénico es un virus de autorreplicación defectuosa que puede producirse delecionando cualquiera o todos de tres especies de genes gag, pol y env que son necesarios para la replicación de partículas de virus. Para infectar eficazmente una célula de ave con este vector de virus, se prefieren vectores de virus que pueden obtenerse convirtiendo artificialmente una proteína de cubierta en un pseudotipo de VSV-G (origen de virus de la estomatitis vesicular), pero la invención no se limita a este tipo de virus.

30 Los vectores de virus de pseudotipo preparados usando una célula de empaquetamiento, virus auxiliar o similar se introducen en un embrión temprano, vaso sanguíneo y corazón mediante el método de microinyección general (Bosselman R. A *et al.* (1989) *Science* 243, 533). Como método de introducción de genes, además de éste, pueden mencionarse lipofección, electroporación y métodos similares.

35 El gen que va a introducirse en el ave en la práctica de la invención no está particularmente restringido, sino que está constituido por un gen marcador, un gen estructural para expresar una proteína prevista, un gen promotor que controla la expresión de estos genes, un gen de señal secretora y similares.

40 Como gen marcador anterior, puede mencionarse un gen de resistencia a neomicina, el gen de  $\beta$ -galactosidasa, gen de LacZ y un gen que codifica para una proteína de fluorescencia tal como GFP (proteína fluorescente verde).

45 El gen estructural anterior para expresar una proteína prevista no está particularmente restringido y puede mencionarse un gen que codifica para un anticuerpo o una enzima, etc., útil en el campo de la industria de genes tal como un anticuerpo monoclonal humano, y similares. También pueden usarse genes de otras sustancias biológicamente activas útiles. Se prefieren particularmente genes estructurales de anticuerpos exógenos tales como un gen de anticuerpo que tiene la región constante que pertenece a la clase de IgG humana, un gen de anticuerpo que tiene la región constante que pertenece a la subclase de IgG1 humana, un gen de anticuerpo que tiene la región constante de IgG de codorniz, IgG de pollo o IgG de ratón en vista de su acumulación preferible en huevos.

50 Además, se prefiere como gen estructural anterior un gen estructural de un anticuerpo quimérico.

El anticuerpo quimérico se refiere a un anticuerpo constituido por dos o más especies de características genéticas diferentes.

55 Convencionalmente, los anticuerpos médicos producidos por hibridoma de ratón se derivan de ratones, por tanto ha existido el problema de que se produzca rechazo por el sistema inmunitario cuando se administran a organismos humanos. Como anticuerpo quimérico anterior, pueden mencionarse, por ejemplo, anticuerpos quiméricos en los que dicho defecto se mejora sustituyendo las regiones distintas de las que se unen a una proteína de antígeno entre anticuerpos de ratón por anticuerpos humanos que no provocan rechazo, tal como un anticuerpo anti-CD2 humano, anticuerpo anti-receptor CD20 y anticuerpo anti-TNF, y algunos de ellos ya se han comercializado como productos farmacéuticos.

60 Todavía más preferido como gen estructural anterior es un gen estructural de un anticuerpo scFv-Fc.

65 Entre los anticuerpos recombinantes médicos, existe un grupo denominado "anticuerpo de bajo peso molecular". En la inmunoglobulina IgG, hay un dominio que comprende heterodímeros de VH y VL denominado Fv: fragmento de

región variable que se une directamente a un antígeno. El dominio Fv solo tiene una capacidad de unión a antígeno suficiente aún cuando tenga sólo aproximadamente 1/5 del peso molecular en relación con IgG. El que puede obtenerse uniendo artificialmente los dominios VH y VL con un ligador peptídico es un anticuerpo de bajo peso molecular denominado scFv: Fv de cadena sencilla, y se sabe que tiene una estabilidad mejorada en comparación con VH y VL solos.

Powers *et al.* (Powers, D.B *et al.* (2000) J Immunol Method. 251, 123) han encontrado que fusionando una parte Fc derivada de IgG1 humana con el scFv, se aumenta la estabilidad en sangre. Se cree que este anticuerpo scFv-Fc es útil para aplicaciones médicas, pero no se produce por *Escherichia coli*, que es un sistema de producción en masa de bajo coste.

Como otra secuencia génica preferible mencionada anteriormente, puede mencionarse un gen estructural de una proteína de fusión.

Un grupo de proteínas artificiales en las que se fusionan partes de dos o más especies de proteínas mediante recombinación génica se denomina proteína de fusión. Entre las que ya se han puesto en uso práctico como productos farmacéuticos, está TNFR-Fc preparada fusionando Fc de inmunoglobulina a un receptor de TNF, LFA3-Fc preparada fusionando Fc a LFA3, o similares. Éstas son proteínas artificiales diseñadas para que tengan una actividad biológica más fuerte fusionando Fc que va a solubilizarse.

En el ave quimérica transgénica G0 de la invención, usando el gen de anticuerpo monoclonal humano, gen de anticuerpo quimérico y gen de anticuerpo scFv-Fc mencionados anteriormente como gen que va a introducirse en el ave, pueden producirse en masa a bajo coste productos farmacéuticos de anticuerpos que han sido convencionalmente difíciles de producir.

Por ejemplo, en el caso del ave quimérica transgénica G0 en la que se introduce un gen de anticuerpo quimérico, el contenido de anticuerpo en sangre es preferiblemente no inferior a 0,5 µg/ml, más preferiblemente no inferior a 5 µg/ml. En clara de huevo, es preferiblemente no inferior a 0,1 µg/ml, más preferiblemente no inferior a 1 µg/ml, y en yema de huevo, es preferiblemente no inferior a 0,1 µg/ml, más preferiblemente no inferior a 1 µg/ml.

Además, en el caso del ave quimérica transgénica G0 en la que se introduce un gen de anticuerpo scFv-Fc, el contenido de anticuerpo en sangre es preferiblemente no inferior a 20 µg/ml, más preferiblemente no inferior a 2000 µg/ml. En clara de huevo, es preferiblemente no inferior a 5 µg/ml, más preferiblemente no inferior a 500 µg/ml, y en yema de huevo, es preferiblemente no inferior a 5 µg/ml, más preferiblemente no inferior a 500 µg/ml.

Como gen de promotor mencionado anteriormente, puede mencionarse un promotor constitutivo. Es preferible cuando el gen del anticuerpo está controlado por el promotor constitutivo puesto que la expresión del gen del anticuerpo se estabiliza. Como promotor constitutivo más preferible, puede mencionarse el promotor de β-actina de pollo.

El método de producción de un anticuerpo de la invención comprende producir el ave quimérica transgénica G0 de la invención, y recuperar un anticuerpo de la sangre y/o huevos del ave quimérica transgénica G0 anterior.

A continuación, se describe el método de producción del ave quimérica transgénica G0 de la invención.

Como dicho método de producción, puede mencionarse uno que comprende incubar un huevo fértil de ave, infectar un embrión temprano después y de manera exclusiva de un periodo blastodérmico inmediatamente tras el desove con un vector de retrovirus de replicación defectuosa, y entonces hacer eclosionar el embrión. Además, puede mencionarse también un método como un método de producción de la invención que comprende incubar un huevo fértil de ave, infectar un embrión temprano tras el transcurso de 24 horas o más desde el inicio de la incubación con un vector de retrovirus de replicación defectuosa, y entonces hacer eclosionar el embrión.

Se prefiere más un método que comprende un embrión temprano en el que se microinyecta un vector de retrovirus de replicación defectuosa en el corazón o un vaso sanguíneo formado en el embrión temprano.

Es decir, el método de producción del ave quimérica transgénica G0 de la invención comprende microinyectar un vector de retrovirus de replicación defectuosa en un huevo fértil tras el transcurso de un tiempo específico desde el desove. Tomando un pollo como ejemplo para el desarrollo temprano de un huevo fértil tras el desove, en primer lugar, el huevo fértil fertilizado dentro de un oviducto comienza a escindirse tras aproximadamente 1,5 horas desde la fertilización. El huevo en el que se inicia la escisión discoidal conectada al estado del citoplasma se escinde durante 1 día antes de liberarse fuera del cuerpo, y se convierte en un embrión denominado blastodermo que consiste en aproximadamente 60.000 células (periodo de blastodermo). Este blastodermo se observa como un anillo blanco con un diámetro de 3 a 4 mm en el centro de la yema del huevo. Este embrión se divide en capas superior e inferior para formar un blastocele. El desove se produce aproximadamente en el momento en el que se forma un hipoblasto. Se forma la estría primitiva, el blastocele se convierte en una estructura triple, es decir, capas superior,

media e inferior, y entonces se forma el triploblasto. Después de eso, se forma un embrión y crece, y eclosiona en el día 22 desde la ovulación. El periodo de blastodermo también se denomina fase X. Puesto que una célula productiva se genera a partir de una parte de las células de esta fase, el huevo fértil de este periodo se usa convencionalmente como diana de introducción de genes.

En la práctica de la invención, el momento en el que un huevo fértil en un periodo de blastodermo inmediatamente tras el desove se coloca en las condiciones medioambientales adecuadas para la eclosión, por ejemplo, en el caso del pollo, una temperatura de 37,7 a 37,8°C y una humedad del 50 al 70%, se fija como hora 0, que se fijó como el inicio de la incubación, y se realizaron diversos tratamientos con transcurros de tiempo. Se observó la formación de un sistema de vasos sanguíneos en la yema de huevo tras 36 horas desde el inicio de la incubación en codornices, y aproximadamente tras 50 horas en pollos, y se observó pulsación del órgano que va a diferenciarse en el corazón.

Para la eclosión del huevo fértil en el que se introduce el gen anterior, puede aplicarse el método que comprende usar una cáscara de huevo artificial desarrollada por los presentes inventores (Kamihira, M. *et al.* (1998) *Develop. Growth Differ.*, 40, 449) y similar.

Como vector de retrovirus de replicación defectuosa, gen que va a introducirse y ave transgénica, que se usan en el método de producción de la invención, pueden mencionarse los mismos que los del ave quimérica transgénica G0 mencionada anteriormente.

El transgén incorporado en el vector de retrovirus de replicación defectuosa contiene preferiblemente una secuencia génica no derivada del retrovirus. En el presente documento, en el método de producción de la invención, como "gen no derivado del retrovirus", puede mencionarse el gen estructural, gen de promotor, gen de señal de secreción anterior y similares. La secuencia génica anterior no derivada de retrovirus es preferiblemente una secuencia génica controlada por el promotor de  $\beta$ -actina de pollo, y se prefiere una secuencia génica que codifica para un gen de anticuerpo o una proteína de fusión.

En el método de producción de la invención, para la microinyección es preferible un vector de retrovirus de replicación defectuosa que tiene títulos no menores de  $1 \times 10^7$  ufc/ml, preferiblemente no menores de  $1 \times 10^8$  ufc/ml, más preferiblemente no menores de  $1 \times 10^9$  ufc/ml en vista de una introducción del gen eficaz.

El ave en la que se introduce el gen en un huevo fértil mediante el método de producción de la invención crece como el ave transgénica que tiene un transgén en sus células somáticas en forma de mosaico. El ave transgénica de la primera generación se denomina ave quimérica transgénica G0.

Tal ave quimérica transgénica G0 obtenida mediante el método de producción de la invención es también un aspecto de la invención.

Cuando nace el ave de la segunda y tercera generación mediante el apareamiento del ave quimérica transgénica G0 y un ave no transgénica, o cada ave quimérica transgénica G0 se genera a partir de una célula productiva que tiene un transgén en el cromosoma, el ave nacida crece hasta formar un individuo que contiene el transgén dentro de las células somáticas de todo el cuerpo. La progenie que hereda el transgén del individuo del ave quimérica transgénica G0 se denomina aves transgénicas G1, G2, G3 a través de las generaciones.

Mediante el apareamiento del ave quimérica transgénica G0 de la invención con un ave no transgénica alogénica o el apareamiento de tipo ave quimérica transgénica G0, el transgén puede transmitirse a la progenie, y también puede producirse un ave transgénica completa que tiene el transgén en las células somáticas de todo el cuerpo. Puesto que el ave transgénica completa tiene células somáticas que tienen un transgén a una alta razón, puede esperarse que la cantidad de producción de proteína recombinante derivada de un transgén aumente en comparación con el ave quimérica transgénica G0. Además, estableciendo la línea del ave transgénica que transmite de manera estable el transgén, se hace posible estabilizar la calidad como sistema de producción de proteínas.

### Mejor modo para llevar a cabo la invención

En lo siguiente, se describe la presente invención en detalle por medio de ejemplos, sin embargo, estos ejemplos no son limitativos del alcance de la invención.

(Ejemplo 1) Preparación de un constructo de vector de expresión de  $\beta$ -galactosidasa

Se produjo el constructo de vector de expresión de  $\beta$ -galactosidasa pMSCVN $\Delta$ A $\beta$  tal como sigue.

1. Se cortó un fragmento de promotor del virus del sarcoma de Rous (VSR) del plásmido pLXRN (producto de BD Biosciences Clontech) usando las enzimas de restricción XhoI y HindIII, y entonces se insertó en los sitios XhoI y HindIII del plásmido pBluecriptIIISK (+) (producto de Stratagene) para producir el plásmido pBlue/RSV.

2. Se cortó un fragmento del gen de  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -Gal) del plásmido pCMV $\beta$  (producto de BD Biosciences Clontech) usando la enzima de restricción NotI, y entonces se insertó en el sitio NotI del plásmido pZeoSV2 (+) (producto de Invitrogen Corporation). El plásmido que tiene la estructura de un gen de  $\beta$ -Gal que se inserta en la misma dirección que el promotor de T7 se denominó pZeo/lacZ.
3. Se cortó un fragmento de promotor del VSR de pBlue/RSV usando las enzimas de restricción XhoI y PstI. Se cortó un fragmento del gen de  $\beta$ -Gal de pZeo/lacZ usando las enzimas de restricción PstI y XhoI. Se unió un fragmento de vector de plásmido pLNHX (producto de BD Biosciences Clontech) tratado con la enzima de restricción XhoI a los dos fragmentos de corte anteriores para producir el plásmido pLNR $\beta$ .
4. Se cortó un fragmento que contenía la repetición terminal larga (LTR) en 5' del virus del sarcoma murino de Moloney (MoMuSV), la señal de empaquetamiento del virus y un gen de resistencia a neomicina (Neo<sup>r</sup>) de pLNHX usando las enzimas de restricción SacII y XhoI, y entonces se unió a un fragmento de vector de pLXRN tratado con las enzimas de restricción SacII y XhoI para producir el plásmido pLXL.
5. Se cortó un fragmento del gen de  $\beta$ -Gal de pZeo/lacZ usando las enzimas de restricción HindIII y XhoI, y entonces se unió a un fragmento de vector de pLXL tratado con las enzimas de restricción HindIII y XhoI para producir el plásmido pLZL.
6. Mediante PCR (94°C/15 segundos, 55°C/30 segundos, 72°C/1,5 minutos: 35 ciclos; ADN polimerasa KOD-Plus (producto de Toyobo Co., Ltd.)) usando dos oligonucleótidos de quimiosíntesis 5'-cggcttagaggaattcagtggtcg-3' (SEQ ID NO:1) y 5'-ccaggatccgacgttgtaaacgacg-3' (SEQ ID NO:2; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción BamHI) como cebadores, se amplificaron el fragmento de la región 5' de un promotor híbrido (promotor Miw) del promotor del VSR y el promotor de  $\beta$ -actina (Act) de pollo a partir del plásmido pMiwZ (Suemori *et al.*, 1990, Cell Diff. Dev. 29: 181 a 185), se cortaron con las enzimas de restricción BamHI y MunI, y entonces se insertaron en los sitios BamHI y MunI del plásmido pGREEN LANTERN-1 (producto de Gibco BRL) para producir el plásmido pGmiw5'.
7. Se cortó un fragmento de la región central del lado en 5' del promotor Miw de pMiwZ usando las enzimas de restricción MunI y ClaI, y entonces se insertó en los sitios MunI y ClaI de pGmiw5' para producir el plásmido pGmiw5'-2.
8. Se cortó un fragmento que contenía la región 5' y la región central del lado 5' del promotor Miw de pGmiw5'-2 usando las enzimas de restricción BamHI y EcoRI, y entonces se insertó en los sitios BamHI y EcoRI de pBluescript IISK (+) para producir el plásmido pBlue/Miw5'.
9. Mediante PCR (98°C/15 segundos, 60°C/30 segundos, 72°C/30 segundos: 35 ciclos) usando dos oligonucleótidos de quimiosíntesis 5'-ccaagcttgccgcagccattgcctttt-3' (SEQ ID NO:3; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción HindIII) y 5'-atacctaggggctgctgctgagggaac-3' (SEQ ID NO:4; la parte subrayada es la parte de la enzima de restricción BlnI) como cebadores, se amplificó un fragmento de la región 3' del promotor Miw de pMiwZ, se cortó con las enzimas de restricción HindIII y BlnI, y entonces se ligó a un fragmento de vector de pLXL tratado con las enzimas de restricción HindIII y BlnI para producir el plásmido pLMiw3'.
10. Se cortó un fragmento de la región central del lado 3' del promotor Miw de pMiwZ usando las enzimas de restricción EcoRI y MboI. Se cortó un fragmento de la región 3' del promotor Miw de pLMiw3' usando las enzimas de restricción MboI y KpnI. Se insertaron los dos fragmentos de corte anteriores en los sitios EcoRI y KpnI de pBlue/Miw5' para producir el plásmido pBlue/Miw.
11. Se cortó un fragmento que contenía la longitud completa del promotor Miw de pBlue/Miw usando las enzimas de restricción BamHI y BlnI, y entonces se ligó a un fragmento de vector de pLXL tratado con las enzimas de restricción BamHI y BlnI para producir el plásmido pLML.
12. Se cortó un fragmento del promotor Act de pLML usando las enzimas de restricción SmaI y XbaI, y entonces se insertó en los sitios EcoRV y XbaI de pBluescript IISK (+) para producir el plásmido pBlue/Act.
13. Se cortó un fragmento del promotor Miw de pLML usando las enzimas de restricción HindIII y BglII, y entonces se ligó a un fragmento de vector de pLZL tratados con las enzimas de restricción HindIII y BamHI para producir el plásmido pLM $\beta$ L.
14. Se cortó un fragmento del promotor Act de pBlue/Act usando las enzimas de restricción Sall y BlnI. Se cortó un fragmento del gen de  $\beta$ -Gal de pLM $\beta$ L usando las enzimas de restricción BlnI y BglII. Se unieron los dos fragmentos de corte anteriores a un fragmento de vector de pLNR $\beta$  tratado con las enzimas de restricción XhoI y BglII para producir el plásmido pLNA $\beta$ .

15. Mediante PCR (98°C/15 segundos, 60°C/30 segundos, 68°C/2 minutos: 30 ciclos) usando dos oligonucleótidos de quimiosíntesis 5'-tttagctagctgcagctcagtcagtcac-3' (SEQ ID NO:5; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción NheI) y 5'-ataatctagaacgcagcgactccgc-3' (SEQ ID NO:6; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción XbaI) como cebadores, se amplificó un fragmento de promotor de actina de intrones defectuosos ( $\Delta$ Act) de pMiwZ, y entonces se cortó un fragmento que contenía una parte del promotor  $\Delta$ Act usando las enzimas de restricción XhoI (el sitio de la enzima de restricción XhoI se produce en un fragmento de amplificación) y XbaI. Se cortó un fragmento que contenía la parte restante del promotor  $\Delta$ Act y el gen de  $\beta$ -Gal de pLNA $\beta$  usando las enzimas de restricción BlnI y BglII. Se unieron los dos fragmentos de corte anteriores a un fragmento de vector de pLNA $\beta$  tratado con las enzimas de restricción XbaI y BglII para producir el plásmido pLN $\Delta$ A $\beta$ .

16. Se cortó un fragmento que contenía una serie de genes de Neo<sup>r</sup>, promotor  $\Delta$ Act y gen de  $\beta$ -Gal de pLN $\Delta$ A $\beta$  usando las enzimas de restricción BlnI y BglII, y entonces se ligó a un fragmento de vector de pXL tratado con las enzimas de restricción BlnI y BglII para producir el plásmido pLN $\Delta$ A $\beta$ -2.

17. Se cortó un fragmento que contenía una serie de genes de Neo<sup>r</sup>, promotor  $\Delta$ Act y gen de  $\beta$ -Gal de pLN $\Delta$ A $\beta$ -2 usando las enzimas de restricción BamHI y BglII, y entonces se ligó a un fragmento de vector del plásmido pMSCVneo (producto de BD Biosciences Clontech) tratado con las enzimas de restricción BamHI y BglII. El plásmido en el que desaparecieron los sitios BamHI y BglII se denominó pMSCVN $\Delta$ A $\beta$ .

La estructura del constructo de vector pMSCVN $\Delta$ A $\beta$  del vector de retrovirus de replicación defectuosa así producido se muestra en la figura 1.

(Ejemplo 2) Preparación de un vector de retrovirus de expresión de  $\beta$ -galactosidasa

Con el fin de preparar un vector de retrovirus a partir del constructo de vector pMSCVN $\Delta$ A $\beta$  producido en el ejemplo 1, se sembraron  $5 \times 10^6$  células de empaquetamiento GP293 (producto de BD Biosciences Clontech) en una placa de cultivo de 100 mm de diámetro y se cultivaron. Se cambió el medio de cultivo por DMEM nuevo (medio de Eagle modificado por Dulbecco), y se introdujeron 8  $\mu$ g de vector p-VSV-G (producto de BD Biosciences Clontech) y 8  $\mu$ g de pMSCVN $\Delta$ A $\beta$  en las células GP293 anteriores mediante el método de lipofección. Tras el transcurso de 48 horas, se recuperó el sobrenadante del cultivo que contenía partículas de virus y se filtró a través de un filtro de acetilcelulosa de 0,45  $\mu$ m (Advantech Co., Ltd.) para eliminar impurezas. Se añadió a la disolución obtenida polibreno (producto de Sigma Corporation) de modo que tuviese una concentración de 10  $\mu$ g/ml para preparar una disolución de virus.

Se añadió la disolución de virus preparada a células GP293 por separado, y tras el cultivo durante 48 horas, se cultivaron las células sucesivamente en un cultivo que contenía 600  $\mu$ g/ml de G418 (producto de GIBCO BRL) para obtener la cepa GP293 transformada de manera estable con G418.

Se cultivó la cepa transformada de manera estable obtenida en una placa de 10 mm de diámetro hasta el 80% de confluencia, y se introdujeron 16  $\mu$ g de vector pVSV-G en la misma mediante el método de lipofección. Tras el transcurso de 48 horas, se recuperaron 12 ml del sobrenadante de cultivo que contenía partículas de virus.

Se sometió este sobrenadante de cultivo a centrifugación a 50.000 g y 4°C durante 1,5 horas para precipitar el virus. Tras la eliminación del sobrenadante, se añadieron 50  $\mu$ l de disolución de Tris-HCl 50 mM (pH 7,8), NaCl 130 mM y EDTA 1 mM al precipitado que contenía las partículas de virus. Entonces, se dejó reposar la mezcla a 4°C durante la noche y se suspendió meticulosamente para recuperar una disolución de virus. El vector de virus así obtenido tenía un título alto de  $10^8$  a  $10^9$  ufc/ml.

Se midió el título del virus tal como sigue. El día antes de la medición, se sembraron  $7 \times 10^4$  células NIH3T3 (adquiridas de la Colección Americana de Cultivos Tipo) en una placa de 35 mm de diámetro y se cultivaron. Se añadió la disolución de virus diluida de  $10^2$  a  $10^6$  veces a cada placa en 1 ml. Tras el transcurso de 48 horas, se determinó la tasa de células que expresaban GFP (proteína fluorescente verde) mediante un microscopio de fluorescencia, y se determinó el título mediante la siguiente fórmula de cálculo.

Título del virus = (número de células) x (tasa de dilución) x (razón de expresión) (ufc/ml)

(Ejemplo 3) Inyección del vector de retrovirus en un embrión de codorniz

Se usó un huevo fértil de codorniz de linaje WE (Japan Bio Science Laboratory CO., Ltd.). El momento en el que este huevo fértil se colocó en una incubadora con un dispositivo de rotación de huevos automático incorporado (producto de Showafuranki Co., Ltd.; tipo P-008) a 37,9°C y humedad del 65% se fijó como el momento de inicio de la incubación (hora 0). Entonces, se llevó a cabo la incubación mientras se rotaba el huevo a 90 grados cada 15 minutos.

Al inicio de la incubación, se esterilizó la cáscara del huevo fértil con etanol al 70%, y se cortó en la parte de extremo redondo-afilado con una cuchilla de diamante (MINIMO 7C710, producto de Minitor Co., Ltd.) un círculo de 2 cm de

diámetro para exponer el embrión. Mientras se observaba el blastodermo con un microscopio estereoscópico, se clavó una aguja preparada plegando el extremo de modo que tuviese un diámetro de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  a partir de un tubo de vidrio (CD-1, producto de Olympus Corporation) usando un extractor de pipeta (PC-10, producto de Olympus Corporation), y se microinyectaron aproximadamente 2  $\mu\text{l}$  de la disolución de virus preparada en el ejemplo 2 en el centro de la cavidad blastodérmica usando un microinyector (Transjector 5246, producto de Eppendorf, Co., Ltd.). Tras llenar con clara de huevo hasta el borde del corte de esta cáscara de huevo, se usaron película de teflón (MilliWrap, producto de Millipore Corporation) y envoltorio de poli(cloruro de vinilideno) (Saran Wrap, producto de Asahi Kasei Corporation) para cubrir el huevo usando clara de huevo como pegamento. Entonces, se llevó a cabo la incubación mientras se rotaba el huevo a 90 grados cada 15 minutos.

Tras el transcurso de 12 y 24 horas desde el inicio de la incubación, se inyectó virus en el huevo fértil de la misma manera. Tras aproximadamente 36 horas desde el inicio de la incubación, se confirmó la generación de un vaso sanguíneo en la superficie de la yema de huevo; una parte del mismo con pulsaciones, por tanto se observó que una parte del mismo se convierte en el corazón con un microscopio estereoscópico. Tras el transcurso de 36, 48 y 55 horas desde el inicio de la incubación, se microinyectaron 2  $\mu\text{l}$  de la disolución de virus preparada en el ejemplo 2 en el corazón usando un microinyector.

(Ejemplo 4) Inyección del vector de retrovirus en un embrión de pollo

Se usó un huevo fértil de pollo (Japan Bio Science Laboratory CO., Ltd.). El momento en el que este huevo fértil se colocó en una incubadora con un dispositivo de rotación de huevos automático incorporado (producto de Showafuranki Co., Ltd.; tipo P-008) a 37,9°C y humedad del 65% se fijó como el momento de inicio de la incubación (hora 0). Entonces, se llevó a cabo la incubación mientras se rotaba el huevo a 90 grados cada 15 minutos.

Al inicio de la incubación, se esterilizó la cáscara del huevo fértil con etanol al 70%, y se cortó en la parte de extremo redondo-afilado con una cuchilla de diamante (MINIMO 7C710, producto de Minitor Co., Ltd.) un círculo de 3,5 cm de diámetro para exponer el embrión. Mientras se observaba el blastodermo con un microscopio estereoscópico, se clavó una aguja preparada plegando el extremo de modo que tuviese un diámetro de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  a partir de un tubo de vidrio (CD-1, producto de Olympus Corporation) usando un extractor de micropipeta (PC-10, producto de Olympus Corporation), y se microinyectaron aproximadamente 2  $\mu\text{l}$  de la disolución de virus preparada en el ejemplo 2 en el centro de la cavidad blastodérmica usando un microinyector (Transjector 5246, producto de Eppendorf, Co., Ltd.). Tras llenar con clara de huevo hasta el borde del corte de esta cáscara de huevo, se usaron película de teflón (MilliWrap, producto de Millipore Corporation) y envoltorio de poli(cloruro de vinilideno) (Saran Wrap, producto de Asahi Kasei Corporation) para cubrir el huevo usando clara de huevo como pegamento. Entonces, se llevó a cabo la incubación mientras se rotaba el huevo a 90 grados cada 15 minutos.

Tras el transcurso de 12 y 24 horas desde el inicio de la incubación, se trató el huevo fértil de la misma manera. Tras aproximadamente 50 horas desde el inicio de la incubación, se confirmó la generación de un vaso sanguíneo en la superficie de la yema de huevo; una parte del mismo con pulsaciones, por tanto se observó que una parte del mismo se convierte en el corazón con un microscopio estereoscópico. Tras el transcurso de 50, 55 y 60 horas desde el inicio de la incubación, se microinyectaron 2  $\mu\text{l}$  de la disolución de virus preparada en el ejemplo 2 en el corazón usando un microinyector.

(Ejemplo 5) Medición de la actividad  $\beta$ -galactosidasa

Tras el transcurso de 115 horas desde el inicio de la incubación, se sacó el embrión de la cáscara del huevo y se lavó con PBS (disolución de tampón fosfato) para eliminar la membrana que rodea al embrión. Se cortó finamente el embrión extraído, y se añadieron 0,8 ml de un tampón de reacción (KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Triton X-100 al 0,1% (producto de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 2-mercaptoetanol 5 mM (producto de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y tampón fosfato 2 mM pH 7,5), y se sometió a disrupción ultrasónica para obtener un líquido celular.

Se incubaron 0,6 ml del líquido celular a 37°C durante 10 minutos, y se añadieron 0,1 ml de un líquido preparado disolviendo 4 mg/ml de o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) (producto de Sigma Corporation) en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,5) calentado de antemano. Tras la reacción, se añadieron 0,3 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M (producto de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y se midió la concentración a la longitud de onda de 420 nm con un medidor de la adsorción.

Se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cuanto a unidad de ONPG (1 unidad: actividad con la que se genera 1  $\mu\text{mol}$  de o-nitrofenol por minuto). Se llevó a cabo el experimento tres veces, y se usó el valor promedio de los mismos como actividad  $\beta$ -galactosidasa.

La relación entre el momento de introducción del gen y el resultado de la medición de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de pollos y codornices se muestra en la figura 2 y la figura 3. En codornices, el gen de  $\beta$ -galactosidasa introducido tras 48 horas de la incubación, y en pollos, el introducido tras 55 horas se expresaron más fuertemente que los introducidos antes. Estos hallazgos sugieren que el mecanismo de inactivación (silenciamiento) de retrovirus para

genes exógenos que tienen los huevos fértiles de aves es notable inmediatamente después de la fertilización, pero se debilita con el transcurso del tiempo. Por tanto, se hace posible producir un ave quimérica transgénica G0 que expresa eficazmente el transgén sin inactivarse introduciendo un gen previsto en un huevo fértil tras el transcurso de un tiempo específico, que depende de la especie de ave.

5 (Ejemplo 6) Eficacia de la expresión génica mediante el título del virus

10 Se diluyó la disolución de virus de  $1 \times 10^8$  ufc/ml preparada en el ejemplo 2 con disolventes de dilución (disolución de Tris-HCl 50 mM (pH 7,8), NaCl 130 mM y EDTA 1 mM) en tres fases de 10 veces, 100 veces y 1000 veces. Por tanto, se prepararon disoluciones de virus con títulos de  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^5$  ufc/ml. Se incubaron huevos fértiles de codorniz, y se microinyectaron en corazones de desarrollo temprano tras 48 horas 2  $\mu$ l de las disoluciones de virus preparadas. De la misma manera, como control, se inyectaron 2  $\mu$ l del disolvente de dilución solo a un corazón de desarrollo temprano tras 48 horas.

15 Tras el transcurso de 115 horas desde el inicio de la incubación, se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa según el ejemplo 5. La relación entre el título del virus y el resultado de la expresión génica en codornices se muestra en la figura 4.

20 De la misma manera, se incubaron huevos fértiles de pollo, y se microinyectaron a corazones de desarrollo temprano tras 55 horas 2  $\mu$ l de las disoluciones de virus preparadas. Como control, se inyectaron 2  $\mu$ l del disolvente de dilución solo a un corazón de desarrollo temprano tras 55 horas.

25 Tras el transcurso de 115 horas desde el inicio de la incubación, se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa según el ejemplo 5. La relación entre el título del virus y el resultado de la expresión génica en pollos se muestra en la figura 5.

30 En la codorniz y el pollo en los que se inyectaron  $1 \times 10^8$  ufc/ml de virus, se observó una notable actividad  $\beta$ -galactosidasa, y en los que se inyectaron concentraciones inferiores, las cantidades de expresión eran bajas. Se sugirió que el título del virus afecta en gran medida a la expresión del transgén, es decir, para expresar eficazmente el transgén con el ave quimérica transgénica G0 de la invención, es eficaz el uso de un vector de replicación defectuosa de alto título.

(Ejemplo 7) Capacidad de transición de un anticuerpo humano a un huevo de codorniz y pollo

35 Se diluyó una mezcla que comprendía anticuerpos humanos que tenían tres subclases (IgG 1, 2 y 3) (producto de Cosmo Bio Co., Ltd.) y las correspondientes tres especies de fragmentos de anticuerpo (Fab-1, Fab-2, Fab-3, Fc-1, Fc-2 y Fc-3) (productos de Cosmo Bio Co., Ltd.) con PBS de modo que tuviese una concentración de 100  $\mu$ g/ml. Se inyectaron 100  $\mu$ l de las disoluciones diluidas en venas bajo las alas de aves adultas de codorniz (tres aves) o aves adultas de pollo (tres aves).

40 Se recogieron los huevos desde el siguiente día hasta el día 20 de la inyección de anticuerpos en las venas, y se cuantificaron los anticuerpos transferidos a los huevos. Se diluyeron la yema de huevo y la clara de huevo hasta el 50% (p/v) y el 10% (v/v) con PBS, respectivamente, y se conservaron en estado congelado para usarse como muestras de medición.

45 (Ejemplo 8) Cuantificación de un anticuerpo en huevos mediante el método de ELISA

50 Se puso un anticuerpo anti-IgG humana (producto de Cosmo Bio Co., Ltd.) diluido con PBS en placas de ELISA a 100  $\mu$ g/pocillo, y se dejó reposar a 4°C durante la noche. Se lavó cada placa con 200  $\mu$ l de disolución de PBS-Tween 20 al 0,05% tres veces, y entonces se añadió disolución de PBS-Tween 20 al 0,05%-leche desnatada al 2% en los pocillos a 150  $\mu$ l/pocillo.

55 Tras dejar reposar las mezclas a temperatura ambiente durante 2 horas, se lavaron los pocillos con 200  $\mu$ l de disolución de PBS-Tween 20 al 0,05% tres veces. Entonces, se colocaron en los mismos, muestras de sangre, clara de huevo y yema de huevo en 120  $\mu$ l y se dejaron reposar las mezclas a 4°C durante la noche. Tras devolver estas placas de ELISA a temperatura ambiente, se lavó cada pocillo con disolución de PBS-Tween 20 tres veces, se puso anticuerpo anti-IgG humana marcado con peróxido (POD) (producto de Cosmo Bio Co., Ltd.) diluido con disolución de PBS-Tween 20 al 0,05% en cada pocillo a 100  $\mu$ l/pocillo, y se dejó reposar durante 1 hora a temperatura ambiente.

60 Se lavaron los pocillos con disolución de PBS-Tween 20 al 0,05% cuatro veces, y se añadieron a los pocillos 100  $\mu$ l de un líquido de coloración (preparado disolviendo 10 mg de o-fenilendiamina (producto de Katayama Chemical Industry Co., Ltd.) en 1 ml de metanol, diluyendo con agua destilada hasta 100 ml, y añadiendo 10  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno (producto de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)). Entonces, se añadieron 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico 8 M para extinguir la reacción, y se determinó la intensidad de fluorescencia a 490 nm con un lector de placas para

65

calcular la concentración a partir de la curva de calibración patrón. Se obtuvo el resultado calculando el promedio de las concentraciones de anticuerpo de las muestras obtenidas de las tres codornices y pollos.

5 Se diluyó el anticuerpo patrón para la construcción de la curva de calibración patrón (producto de Cosmo Bio Co., Ltd.) con yema de huevo al 50%-PBS (p/v).

Las concentraciones de anticuerpo acumulado en huevos de codorniz y pollo se muestran en la figura 6 y 7. Las concentraciones de fragmento Fab y Fc acumulado en huevos de codorniz y pollo se muestran en la figura 8, 9, 10 y 11.

10 En codornices y pollos, se encontró que el anticuerpo de IgG humana, en subclase, IgG2 humana e IgG1 humana, se acumulaba eficazmente en huevos. Además, puesto que el fragmento Fc mostró alta capacidad de transición a huevos, se sugirió que el receptor de Fc interviene en la transición de IgG humana.

15 (Ejemplo 9) Producción de un constructo de vector de expresión de anticuerpo anti-CD2

Se produjeron los constructos de vector para la expresión de anticuerpo anti-CD2 pMSCV/GΔAH, pMSCV/GΔAL y pMSCV/GΔALIH tal como sigue.

20 1. Se obtuvo ARNm a partir de la célula de hibridoma que produce anticuerpos humanos (IgM) D253-15-6 (Colección Americana de Cultivos Tipo HB-8789) usando el kit de purificación de ARNm Quick Prep Micro (producto de Pharmacia K.K.), y se preparó una biblioteca de ADNc usando el kit de síntesis de ADNc First-Strand (producto de Pharmacia K.K.) a partir del ARNm obtenido. Mediante PCR (94°C/1 minuto, 50°C/1 minuto, 72°C/1,5 minutos: 25 ciclos; Taq ADN polimerasa (producto de PerkinElmer, Inc.)) usando dos oligonucleótidos de quimiosíntesis 5'-atcctcgagaggccaaagtacagtg-3' (SEQ ID NO:7; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción XhoI) y 5'-ccggatccctaactctcccctgtgaagct-3' (SEQ ID NO:8; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción BamHI) como cebadores, se amplificó un fragmento de gen de región constante k de cadena L de anticuerpo humano (hCk) a partir de la biblioteca de ADN anterior, se cortó con las enzimas de restricción XhoI y BamHI y entonces se insertó en los sitios XhoI y BamHI del plásmido pBluescript IKS (-), (producto de Stratagene) para producir el plásmido pBlue/hCk.

35 2. De la misma manera, mediante PCR usando dos oligonucleótidos de quimiosíntesis 5'-agggccgctacaggtgtccactccgacatcgatgaccagctctcc-3' (SEQ ID NO:9; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción NotI) y 5'-cctctcgaggatagaagttattcagcaggcacac-3' (SEQ ID NO:10; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción XhoI) como cebadores, se amplificó un fragmento de gen de región variable de cadena L de anticuerpo humano (hVL) a partir de la biblioteca de ADN anterior, se cortó con las enzimas de restricción NotI y XhoI y entonces insertó en los sitios NotI y XhoI de pBluescript IKS (-) para producir el plásmido pBlue/hVL.

40 3. De la misma manera, mediante PCR usando dos oligonucleótidos de quimiosíntesis 5'-acctcgagcgtggcgggtggctgctgcaca-3' (SEQ ID NO:11; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción XhoI) y 5'-actaagcttacggtgtgacaggtgggttacc-3' (SEQ ID NO:12; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción HindIII) como cebadores, se amplificó un fragmento de gen de región constante μ de cadena H de anticuerpo humano (hCμ) a partir de la biblioteca de ADN anterior, se cortó con las enzimas de restricción XhoI y HindIII y entonces se insertó en los sitios XhoI y HindIII de pBluescript IKS (-) para producir el plásmido pBlue/hCP.

45 4. De la misma manera, mediante PCR usando dos oligonucleótidos de quimiosíntesis 5'-agggccgctacaggtgtccactccgaggtgcagctgggtgagctctgg-3' (SEQ ID NO:13; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción NotI) y 5'-cacgctcgaggtatccgacgggaattctcacagga-3' (SEQ ID NO:14; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción XhoI) como cebadores, se amplificó un fragmento de gen de región variable de cadena H de anticuerpo humano (hVH) a partir de la biblioteca de ADN anterior, se cortó con las enzimas de restricción NotI y XhoI y entonces se insertó en los sitios NotI y XhoI de pBluescript IKS (-) para producir el plásmido pBlue/hVH.

50 5. A partir de pBlue/hCk, se cortó el fragmento de gen de hCk usando las enzimas de restricción XhoI y BamHI, y entonces se insertó en los sitios XhoI y BamHI del plásmido pCEP4 (producto de Invitrogen Corporation) para producir el plásmido pCEP4/hCk.

55 6. Se hibridaron dos oligonucleótidos de quimiosíntesis 5'-cccaagcttgatctccactgggatgggtggggccctctctgtgctg-3' (SEQ ID NO:15; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción HindIII) y 5'-ccggatccctaactctcccctgtgaagct-3' (SEQ ID NO:16; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción BamHI) a lo largo de 21 pb con un extremo 3' complementario para producir un fragmento de gen de la región de penetración en la membrana del receptor de factor de crecimiento epidérmico (TM) mediante reacción de síntesis de ADN bicatenario usando ADN polimerasa de T4 (Takara Shuzo Co., Ltd.). Se trató el fragmento de gen de TM obtenido con las enzimas de restricción HindIII y BamHI, y entonces se insertó en los sitios HindIII y BamHI de pBluescript IKS (-) para producir el plásmido pBlue/TM.

## ES 2 394 792 T3

7. A partir de pBlue/hC<sub>μ</sub>, se cortó el fragmento del gen de hC<sub>μ</sub> usando las enzimas de restricción XhoI y HindIII, y entonces se insertó en los sitios XhoI y HindIII de pBlue/TM para producir el plásmido pBlue/hC<sub>μ</sub>TM.
8. A partir de pBlue/hC<sub>μ</sub>TM, se cortó un fragmento que contenía una serie de genes de hC<sub>μ</sub> y gen de TM usando las enzimas de restricción XhoI y BamHI, y entonces se insertó en los sitios XhoI y BamHI de pCEP4 para producir el plásmido pCEP4/hC<sub>μ</sub>TM.
9. Se cortó pCEP4/hC<sub>μ</sub>TM con la enzima de restricción BamHI, y se trató el extremo para que fuese liso con ADN polimerasa de T4 para producir el plásmido pCEP4/hC<sub>μ</sub>TMΔB mediante autoligamiento.
10. Mediante mutagénesis específica de sitio usando un oligonucleótido de quimiosíntesis 5'-tgaagacagatgcccgcgcccacagttcgtt-3' (SEQ ID NO:17; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción NarI), se introdujo el sitio de la enzima de restricción NarI en el extremo 3' de hVL contenido en pBlue/hVL sin cambiar los codones de aminoácidos para producir el plásmido pBlue/hVLN.
11. Mediante mutagénesis específica de sitio usando un oligonucleótido de quimiosíntesis 5'-tggggcggatgcccgcgcccacagttcgtt-3' (SEQ ID NO:18; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción BamHI), se introdujo el sitio de la enzima de restricción BamHI en el extremo 3' de hVL contenido en pBlue/hVL sin cambiar los codones de aminoácidos para producir el plásmido pBlue/hVHB.
12. Se obtuvo ARNm de la célula de hibridoma que produce anticuerpos de ratón anti-CD2 humana TS2/18.1.1 (Colección Americana de Cultivos Tipo HB-195) usando el kit de purificación de ARNm Quick Prep Micro, y se preparó una biblioteca de ADNc usando el kit de síntesis de ADNc First-Strand a partir del ARNm obtenido. Mediante PCR usando dos oligonucleótidos de quimiosíntesis 5'-cgcgcccgcctcagggaaagttgaagatg-3' (SEQ ID NO:19; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción NotI) y 5'-cgcgcccgcctcagggaaagttgaagatg-3' (SEQ ID NO:20; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción NarI) como cebadores, se amplificó un fragmento de gen de región variable de cadena L de anticuerpo de ratón (mVL) a partir de la biblioteca de ADNc anterior, se cortó con las enzimas de restricción NotI y NarI, y entonces se insertó en los sitios NotI y NarI de pBlue/hVLN para producir el plásmido pBlue/mVL.
13. De la misma manera, mediante PCR usando dos oligonucleótidos de quimiosíntesis 5'-cgcgcccgcgaacacggamccctcaccatg-3' (SEQ ID NO:21; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción NotI) y 5'-cggatcctgcagagacagtgaccagatg-3' (SEQ ID NO:22; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción BamHI) como cebadores, se amplificó un fragmento de gen de región variable de cadena H de anticuerpo de ratón (mVH) a partir de la biblioteca de ADNc anterior, se cortó con las enzimas de restricción NotI y BamHI y entonces se insertó en los sitios NotI y BamHI de pBluescript IKS (-) para producir el plásmido pBlue/mVH.
14. A partir de pBlue/mVL, se cortó el fragmento de gen de mVL con las enzimas de restricción NotI y XhoI, y entonces se insertó en los sitios NotI y XhoI de pCEP4/hCk para producir el plásmido pCEP4/IgLk.
15. A partir de pBlue/hVHB, se cortó el fragmento de gen de hVH con las enzimas de restricción NotI y XhoI, y entonces se insertó en los sitios NotI y XhoI de pCEP4/hC<sub>μ</sub>TMΔB para producir el plásmido pCEP4/hlgH<sub>μ</sub>TM.
16. A partir de pBlue/mVH, se cortó el fragmento de gen de mVH con las enzimas de restricción NotI y BamHI, y entonces se unió a un fragmento de vector de pCEP4/hlgH<sub>μ</sub>TM tratado con las enzimas de restricción NotI y BamHI para producir el plásmido pCEP4/IgH<sub>μ</sub>TM.
17. A partir del plásmido pMSCVneo (producto de BD Biosciences Clontech), se eliminó un fragmento que contenía una serie de promotores de fosfoglicerato cinasa (PGK) murina y gen de Neo<sup>r</sup> con las enzimas de restricción BglII y BamHI, y se produjo el plásmido pMSCV mediante autoligamiento del fragmento de vector que quedaba.
18. A partir del plásmido pGREEN LANTERN-1 (producto de Gibco BRL), se cortó el fragmento de gen de GFP con la enzima de restricción NotI, y entonces se insertó en el sitio NotI de pZeoSV2 (+). El plásmido que tenía la estructura del gen de GFP insertado en la misma dirección que el promotor de T7 se denominó pZeo/GFP.
19. A partir de pZeo/GFP, se cortó el fragmento del gen de GFP con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI, y entonces se unió a un fragmento de vector de pMSCV tratado con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI para producir el plásmido pMSCV/G.
20. Se obtuvo ARNm a partir de la célula de mieloma que produce anticuerpos humanos (IgG1) IM-9 (Colección Japonesa de Biorrecursos de Investigación 0024) usando un kit de aislamiento de ARNm (producto de Roche Ltd.), y se preparó una biblioteca de ADNc usando ReverTra Ace (producto de Toyobo Co., Ltd.) a partir del ARNm obtenido. Mediante PCR (95°C/2 minutos, 52°C/30 segundos, 74°C/3 minutos: 30 ciclos; Pfu ADN polimerasa (producto de Promega Corporation)) usando dos oligonucleótidos de quimiosíntesis 5'-caagcttcaagggcccat-3' (SEQ ID NO:23) y 5'-atttaccggagacagga-3' (SEQ ID NO:24), se amplificó un fragmento de gen de región constante γ1 de

- cadena H de anticuerpo humano (hC $\gamma$ 1) a partir de la biblioteca de ADNc anterior. Además, mediante PCR (94°C/15 segundos, 58°C/30 segundos, 68°C/1 minuto: 30 ciclos; ADN polimerasa KOD-plus) usando dos oligonucleótidos de quimiosíntesis 5'-ataggatccgctagcttcaagggcccatcg-3' (SEQ ID NO:25; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción BamHI) y 5'-agcaagcttcatttaccggagacagga-3' (SEQ ID NO:26; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción HindIII) como cebadores, se amplificó el fragmento de gen de hC $\gamma$ 1 a partir del producto de PCR anterior, se cortó con las enzimas de restricción BamHI y HindIII y entonces se insertó en los sitios BamHI y HindIII de pBluescript IISK (+) para producir el plásmido pBlue/hC $\gamma$ 1.
21. A partir de pCEP4/IgH $\mu$ TM, se cortó el fragmento de gen de mVH con las enzimas de restricción HindIII y BamHI. A partir de pBlue/hC $\gamma$ 1, se cortó el fragmento de gen de hC $\gamma$ 1 con las enzimas de restricción BamHI y HindIII. A un fragmento de vector de plásmido pETBlue-2 (producto de Novagen, Inc.) tratados con la enzima de restricción HindIII, se le unieron los dos fragmentos de corte anteriores para producir el plásmido pETBlue/IgH $\gamma$ 1.
22. A partir de pETBlue/IgH $\gamma$ 1, se cortó un fragmento de gen de  $\gamma$ 1 de cadena H de anticuerpo (IgH $\gamma$ 1) con la enzima de restricción HindIII, y se insertó en el sitio HindIII de pMSCV/G. El plásmido que tenía la estructura del gen de IgH $\gamma$ 1 insertado en la misma dirección que el gen de GFP se denominó pMSCV/GH.
23. Mediante PCR (94°C/15 segundos, 50°C/30 segundos, 68°C/1 minuto: 10 ciclos; 94°C/15 segundos, 62°C/30 segundos, 68°C/1 minuto: 30 ciclos) usando dos oligonucleótidos de quimiosíntesis 5'-acgcgtcgacgctgcatgcagctcattg-3' (SEQ ID NO:27; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción Sall) y 5'-acgcgtcgacaacgcagcagctcccg-3' (SEQ ID NO:28; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción Sall) como cebadores, se amplificó el fragmento de promotor  $\Delta$ Act de pMiwZ, se cortó con la enzima de restricción Sall y se insertó en el sitio Sall de pETBlue-2 para producir el plásmido pETBlue/ $\Delta$ Act.
24. A partir de pETBlue/ $\Delta$ act, se cortó el fragmento de promotor  $\Delta$ Act con la enzima de restricción Sall y se insertó en el sitio XhoI de pMSCV/GH. El plásmido que tenía la estructura del promotor  $\Delta$ Act insertado en la misma dirección que el gen de IgH $\gamma$ 1 se denominó pMSCV/G $\Delta$ AH.
25. Mediante PCR (95°C/30 segundos, 50°C/30 segundos, 74°C/2 minutos: 10 ciclos; 95°C/30 segundos, 60°C/30 segundos, 74°C/2 minutos: 30 ciclos; Pfu ADN polimerasa) usando dos oligonucleótidos de quimiosíntesis 5'-aatgtcgacatggtgtccacttctcagctc-3' (SEQ ID NO:29; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción Sall) y 5'-ttcgtcgacctaactctcccctgttgaa-3' (SEQ ID NO:30; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción Sall) como cebadores, se amplificó un fragmento de gen de k de cadena L de anticuerpo (IgLk) a partir de pCEP4/IgLk, se cortó con la enzima de restricción Sall y entonces se insertó en el sitio Sall de pETBlue-2 para producir el plásmido pETBlue/IgLk.
26. A partir de pETBlue/ $\Delta$  Act, se cortó el fragmento de promotor  $\Delta$ Act con la enzima de restricción Sall y entonces se insertó en el sitio XhoI de pMSCV/G. El plásmido que tenía la estructura del promotor  $\Delta$ Act insertado en la misma dirección que el gen de GFP se denominó pMSCV/G $\Delta$ A.
27. A partir de pETBlue/IgLk, se cortó el fragmento de gen de IgLk con la enzima de restricción Sall y entonces se insertó en el sitio Sall de pMSCV/G $\Delta$ A. El plásmido que tenía la estructura del fragmento del gen de IgLk insertado en la misma dirección que el promotor  $\Delta$ Act se denominó pMSCV/G $\Delta$ AL.
28. Mediante PCR (94°C/15 segundos, 60°C/30 segundos, 68°C/1 minuto: 30 ciclos) usando dos oligonucleótidos de quimiosíntesis 5'-acgcgtcgacgcccctctccctcccc-3' (SEQ ID NO:31; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción Sall) y 5'-ccgctcgagattatcatcgtgttttcaaaggaaaccagctc-3' (SEQ ID NO:32; la parte subrayada es el sitio de la enzima de restricción XhoI) como cebadores, se amplificó el fragmento IRES del plásmido pLXIN (producto de BD Biosciences Clontech), se cortó con las enzimas de restricción Sall y XhoI y entonces se insertó en los sitios Sall y XhoI de pETBlue-2 para producir el plásmido pETBlue/IRES.
29. A partir de pETBlue/IRES, se cortó el fragmento IRES con las enzimas de restricción Sall y XhoI, y entonces se insertó en el sitio Sall de pMSCV/G $\Delta$ AH. El plásmido que tenía la estructura de IRES insertado en la misma dirección que el gen de IgH $\gamma$ 1 se denominó pMSCV/G $\Delta$ AIH.
30. A partir de pETBlue/IgLk, se cortó el fragmento del gen de IgLk con la enzima de restricción Sall y entonces se insertó en el sitio Sall de pMSCV/G $\Delta$ AIH. El plásmido que tenía la estructura del gen de IgLk insertado en la misma dirección que el promotor  $\Delta$ Act se denominó pMSCV/G $\Delta$ ALIH.
- Los constructos de vector así producidos de vector de retrovirus de replicación defectuosa pMSCV/G $\Delta$ AH, pMSCV/G $\Delta$ AL y pMSCV/G $\Delta$ ALIH se muestran en la figura 12.

(Ejemplo 10) Producción de codorniz quimérica transgénica G0 que expresa anticuerpo anti-CD2

Según el ejemplo 2, se prepararon tres especies vectores de retrovirus a partir de los constructos de vector pMSCV/GΔAH, pMSCV/GΔAL y pMSCV/GΔALIH. Se midieron los títulos de estos vectores de retrovirus y se encontró que eran de  $10^8$  ufc/ml a  $10^9$  ufc/ml.

5 Se microinyectaron los vectores de retrovirus obtenidos en corazones de huevos fértiles de codorniz tras 36 horas desde el inicio de la incubación según el ejemplo 3, y se incubaron los huevos mientras se rotaban los huevos a 90 grados cada 15 minutos a 37,9°C y una humedad del 65%.

10 Con el fin de provocar que un anticuerpo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada se exprese en animales transgénicos, es presumible un método que comprende introducir un vector que expresa una cadena ligera y un vector que expresa una cadena pesada individualmente, y un método que comprende dividir genes que expresan una cadena ligera y genes que expresan una cadena pesada con una secuencia tal como IRES, y la introducción de los mismos en el mismo vector. Por tanto, se llevó a cabo la inyección por separado en un caso en el que se infectaron pMSCV/GΔAH y pMSCV/GΔAL al mismo tiempo (ejemplo 11 y ejemplo experimental 1), y un caso en el que se introdujo solo un vector preparado mediante pMSCV/GΔALIH (ejemplo 11 y ejemplo experimental 2).

15 Tras 48 horas desde el inicio de la incubación, se confirmó que la generación avanzaba de manera normal, y entonces se transfirió el embrión en el que se introdujo el virus a un huevo de gallina de tamaño S en el que se agujereó un círculo de 4 cm de diámetro en el extremo redondo-romo. Colocando el embrión en la parte superior para que estuviese expuesto al aire, se añadieron 0,5 ml de una disolución de lactato de sodio (producto de Sigma Corporation) suspendida en clara de huevo a la concentración de 50 mg/ml, y se selló el huevo con envoltorio usando clara de huevo como pegamento. Se colocó de nuevo el huevo en una incubadora, y se incubó durante 13 días a 37,9°C y una humedad del 65% con rotaciones a 60 grados cada hora. Entonces, se detuvo la rotación y se dejó reposar el huevo. Cuando el embrión cambió a respiración pulmonar, se realizó un pequeño agujero en el envoltorio con una aguja para ayudar en la respiración. Cuando se redujo la sangre en la membrana corioalantoica, se sacó la cría de pollo del incubador y eclosionó.

(Ejemplo 11) Determinación de la concentración de anticuerpo anti-CD2 en suero y huevo

30 Se criaron codornices quiméricas transgénicas G0 eclosionadas en el ejemplo 10 durante un mes para hacer crecer crías de polluelos. Tras 30 y 60 días, se tomaron muestras de sangre de las venas bajo las alas de las codornices transgénicas G0 crecidas para obtener muestras de sangre. Se centrifugó la sangre obtenida durante 10 minutos a 15.000 rpm, y se determinó la cantidad de anticuerpo anti-CD2 a partir del suero obtenido como sobrenadante.

35 Tras 1,5 meses desde la eclosión, se recogieron huevos de codornices transgénicas hembra que iniciaron la puesta de huevos, y se determinó la cantidad de anticuerpo anti-CD2 en clara de huevo y yema de huevo preparada según el ejemplo 7 mediante el método de ELISA según el ejemplo 8.

Se muestran los resultados de cuantificación del ejemplo experimental 1 y el ejemplo experimental 2.

40 (Ejemplo experimental 1)

La codorniz quimérica transgénica G0 (número de identificación individual n.º 1113) infectada simultáneamente con vectores (de  $3$  a  $4 \times 10^8$  ufc/ml) preparados a partir de pMSCV/GΔAH y pMSCV/GΔAL expresaba anticuerpo anti-CD2 a concentraciones de 0,6 µg/ml en yema de huevo y 0,5 µg/ml en clara de huevo.

(Ejemplo experimental 2)

50 La codorniz quimérica transgénica G0 (n.º 4202) en la que se introdujo un vector preparado a partir de pMSCV/GΔALIH ( $5 \times 10^8$  ufc/ml) expresaba solo 5,2 µg/ml de anticuerpo anti-CD2 en suero.

(Ejemplo 12) Producción de un constructo de vector de expresión de anticuerpo scFv-Fc

55 Se produjo el constructo de vector de expresión de anticuerpo ScFv-Fc pMSCV/scFv-Fc tal como sigue.

1. Se hibridaron dos oligonucleótidos de quimiosíntesis que tenían extremos 5' fosforilados 5'-ctagaccatgaggtcttctgtaaatcttgcttgcttctcctgcccctggctgctctggg-3' (SEQ ID NO:33; ctaga es el extremo de sitio de reconocimiento de XbaI, y gg es el extremo de sitio de reconocimiento de HaeIII) y 5'-cccagagcagccagggcaggaagcaagcaccagattagcaaaagacctcatggt-3' (SEQ ID NO:34; cc es el extremo de sitio de reconocimiento de XbaI, y t es el extremo de sitio de reconocimiento de HaeIII) para preparar un fragmento de gen de señal de secreción de lisozima. Mediante PCR (94°C/15 segundos, 58°C/30 segundos, 68°C/1 minuto: 30 ciclos; ADN polimerasa KOD-Plus) usando dos oligonucleótidos de quimiosíntesis 5'-gcgtttaaagtgacgttggacgtccg-3' (SEQ ID NO:35; ttaaaa es el sitio de la enzima de restricción DraI) y 5'-attagatccgcgcttaaggacgtcagg-3' (SEQ ID NO:36; ggatcc es el sitio de la enzima de restricción BamHI) como cebadores, se amplificó un fragmento de gen de scFv a partir del plásmido pPDS/scFv que contiene un gen de un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) preparado a partir

del gen de región variable de anticuerpo de pollo de célula HUC2-13 (Nakamura *et al.*, 2000, y Cytotechnology 32: 191-198), y se cortó con las enzimas de restricción DraI y BamHI. Se insertaron los dos fragmentos preparados anteriormente en los sitios XbaI y BamHI de pBluescript IISK (+) para producir el plásmido pBlue/scFv.

5 2. Se cortó el fragmento de gen de scFv con las enzimas de restricción NotI y BamHI de pBlue/scFv, y entonces se insertó en los sitios NotI y BamHI de pCEP4 para producir el plásmido pCEP4/scFv.

3. Se obtuvo ARNm a partir de la célula de mieloma que produce IgG1 humana IM-9 usando el kit de aislamiento de ARNm, y se preparó una biblioteca de ADNc usando ReverTra Ace a partir del ARNm obtenido. Mediante PCR (95°C/2 minutos, 52°C/30 segundos, 74°C/3 minutos: 30 ciclos; Pfu ADN polimerasa) usando dos oligonucleótidos de quimiosíntesis 5'-caagctcaagggcccat-3' (SEQ ID NO:23) y 5'-atttaccggagacagga-3' (SEQ ID NO:24) como cebadores, se amplificó el fragmento de gen de hC $\gamma$ 1 a partir de la biblioteca de ADNc anterior. Además, mediante PCR (94°C/15 segundos, 58°C/30 segundos, 68°C/1 minuto: 30 ciclos; ADN polimerasa KOD-plus) usando dos oligonucleótidos de quimiosíntesis 5'-attaggatccgagcccaaatctgtgacaaaactc-3' (SEQ ID NO:37; ggatcc es el sitio de la enzima de restricción BamHI) y 5'-agcaagcttcatttaccggagacagga-3' (SEQ ID NO:26; aagctt es el sitio de la enzima de restricción HindIII) como cebadores, se amplificó un fragmento de gen de región Fc de  $\gamma$ 1 de cadena H de anticuerpo humano (Fc) a partir del producto de PCR anterior, se cortó con las enzimas de restricción BamHI y HindIII, y entonces se insertó en los sitios BamHI y HindIII de pBluescript IISK (+) para producir el plásmido pBlue/Fc.

4. A partir de pCEP4/scFv, se cortó un fragmento de gen de scFv con las enzimas de restricción HindIII y BamHI. A partir de pBlue/Fc, se cortó un fragmento de gen de Fc con las enzimas de restricción BamHI y HindIII. Se insertaron los dos fragmentos de corte anteriores en el sitio HindIII de pBluescript IISK (+) para producir el plásmido pBlue/scFv-Fc.

5. A partir de pBlue/scFv-Fc, se cortó un fragmento de gen que tiene la estructura de FC de  $\gamma$ 1 de cadena H de anticuerpo humano unido a una región variable de anticuerpo de cadena sencilla de pollo (scFv-Fc) con la enzima de restricción HindIII, y se unió a un fragmento de vector pMSCV/G $\Delta$ AH tratado con la enzima de restricción HindIII. El plásmido que tenía la estructura de un gen de scFv-Fc unido en la misma dirección que el promotor  $\Delta$ Act se denominó pMSCV/G $\Delta$ AscFv-Fc.

La estructura del constructo de vector así producido pMSCV/G $\Delta$ AscFv-Fc del vector de virus retrospectivo de replicación defectuosa se muestra en la figura 13.

35 (Ejemplo 13) Producción de codornices quiméricas transgénicas G0 que expresan anticuerpo scFv-Fc

Según el ejemplo 2, se preparó un vector de retrovirus a partir del constructo de vector pMSCV/G $\Delta$ AscFv-Fc. Se determinó el título de este vector de retrovirus y se encontró que era de  $10^8$  ufc/ml a  $10^9$  ufc/ml.

40 Según el ejemplo 3, se microinyectó la disolución del vector de virus obtenido en los corazones de huevos fértiles de codorniz tras 36 horas desde el inicio de la incubación. Los huevos eclosionaron según el ejemplo 10 para producir codornices quiméricas transgénicas G0.

45 (Ejemplo 14) Determinación de la concentración de scFv-Fc en suero y huevo

Se criaron codornices quiméricas transgénicas G0 producidas en el ejemplo 13 durante un mes para hacer crecer crías de polluelo. Tras el transcurso de 30 y 60 días, se tomaron muestras de sangre de las venas bajo las alas de las codornices quiméricas transgénicas G0 crecidas (número de identificación individual n.º 3303, n.º 3306, n.º 3310, n.º 3311 y n.º 3313) para obtener muestras de sangre. Se centrifugó la sangre obtenida a 15.000 rpm durante 10 minutos, y se determinó la cantidad de anticuerpos scFv-Fc a partir del suero obtenido como sobrenadante.

Se recogieron huevos de codornices transgénicas hembra que iniciaron la puesta de huevos (número de identificación individual n.º 3310) tras 1,5 meses desde la eclosión, y se cuantificó la cantidad de anticuerpo scFv-Fc en clara de huevo y yema de huevo preparada según el ejemplo 7 mediante el método de ELISA según el ejemplo 8.

Se construyó la curva de calibración patrón usando un scFv-Fc purificado. Se introdujo el constructo de vector pMSCV/scFv-Fc producido en el ejemplo 12 en la célula GP293 mediante el método de lipofección, y se centrifugó el sobrenadante de cultivo a 3000 rpm y 4°C durante 10 minutos para eliminar la materia sólida. Mientras se enfriaba, se agitó este sobrenadante y se añadió gradualmente sulfato de amonio finamente triturado de modo que tuviese una saturación del 50% (313 g de sulfato de amonio/1000 ml de agua) para precipitar la proteína. Se dejó reposar la mezcla a 4°C durante la noche, y se centrifugó a 15.000 rpm y 4°C durante 10 minutos para precipitar completamente la proteína. Entonces se disolvió la proteína precipitada en una pequeña cantidad de PBS, y se dializó mediante 2 l de PBS tres veces para eliminar el sulfato de amonio.

Se llevó a cabo el lavado inicial de la columna de proteína G para la purificación (producto de Perseptive Biosystems, Inc.) usando 10 ml de un 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 un tampón de lavado (20% de ácido acético, 80% de agua destilada) y 10 ml del tampón de unión (velocidad de flujo de 2 ml/min.) en este orden. Se hizo fluir el líquido de proteína disuelta en PBS a 1 ml/min. y se absorbió un scFv-Fc sobre la columna. Haciendo fluir 20 ml del tampón de unión a 1,7 ml/min., se eliminó la proteína no necesaria, y un tampón de elución (preparado con glicina 7,507 g/l y HCl 2 N hasta un pH de 2,5 a 3,0) a 1,5 ml/min. para eluir el scFv-Fc.

Se dializó la fracción eluida con PBS (2 l) tres veces para obtener un scFv-Fc purificado, y se cuantificó la concentración de proteína a partir de la adsorción a una longitud de onda de 280 nm.

La cantidad del scFv-Fc en suero sanguíneo muestreado tras 30 y 60 días de las codornices quiméricas transgénicas G0 producidas en el ejemplo 14 se muestra en la figura 14. La codorniz quimérica transgénica G0 en la que se introdujo un gen de expresión de anticuerpo scFv-Fc expresaba de aproximadamente 2 mg/ml a 4 mg/ml de anticuerpo en suero en el día 30, y tres de cinco también mostraban el mismo grado de cantidad de expresión.

A partir del día en el que la codorniz quimérica transgénica G0 (n.º 3310) comenzó la puesta de huevos, la cantidad de scFv-Fc en yema de huevo y clara de huevo se muestra en la figura 15. El anticuerpo se expresó en aproximadamente de 500 µg/ml a 1 mg/ml en clara de huevo y yema de huevo. Aunque hubo una ligera variación desde el inicio de la puesta de huevos hasta el día 17, se mantuvo una cantidad de expresión estable.

(Ejemplo 15) Confirmación de la estructura de scFv-Fc

A partir de 1 ml de suero de codorniz quimérica transgénica G0 producida en el ejemplo 13, se purificó un scFv-Fc a partir del precipitado de sulfato de amonio y la columna de proteína G según el ejemplo 10. Se analizó el scFv-Fc purificado mediante SDS-PAGE, y el resultado se muestra en la figura 16. A partir del carril no tratado, se muestra que el peso molecular de scFv-Fc era de aproximadamente 120 kDa. Puesto que el peso molecular del scFv-Fc sometido a tratamiento de reducción era aproximadamente la mitad de el del no tratado (aproximadamente 60 kDa), se encontró que el scFv-Fc producido por una codorniz quimérica transgénica G0 forma un dímero mediante un enlace S-S. Esto correspondía a la característica estructural del scFv-Fc que tiene un residuo de cisteína implicado en un enlace S-S en la parte de Fc, por tanto se sugirió que el scFv-Fc producido por una codorniz quimérica transgénica G0 conservaba la estructura correcta.

(Ejemplo 16) Producción de pollos quiméricos transgénicos G0 que expresan la proteína de fusión TNFR-Fc

Según el ejemplo 9, se produjo el constructor de vector de expresión de TNFR-Fc, y se produjo un vector de retrovirus según el ejemplo 2. El título de este vector de retrovirus era de  $1,7 \times 10^7$  ufc/ml.

Se microinyectó la disolución de vector de virus obtenida en corazones de huevos fértiles de pollo tras 55 horas desde el inicio de la incubación según el ejemplo 4, y eclosionaron según el ejemplo 10 para producir pollos quiméricos transgénicos G0.

Se inyectó la disolución en ocho huevos fértiles, y eclosionaron cuatro aves. Se cuantificó TNFR-Fc en suero según el ejemplo 14, y se encontró que se expresaba TNFR-Fc de 50 µg/ml como máximo.

### Aplicabilidad industrial

El ave quimérica transgénica G0 de la presente invención puede expresar eficazmente un gen introducido usando un vector de retrovirus de replicación defectuosa sin provocar inactivación. Además, el método de producción de un ave quimérica transgénica G0 de la presente invención hace posible introducir un gen de un anticuerpo quimérico, por ejemplo de un anticuerpo scFv-Fc, y producir aves que pueden expresar eficazmente el anticuerpo en sangre y huevos. Además, el método de producción de un anticuerpo de la presente invención comprende producir un ave quimérica transgénica G0 que produce un anticuerpo quimérico, por ejemplo un anticuerpo scFv-Fc, recuperar y purificar el anticuerpo del suero y huevos del ave, por tanto se hace posible la producción eficaz de un anticuerpo.

### Lista de secuencias

<110> Kaneka Corporation, Nagoya Industrial Science Research Institute (Chubu Technology Licensing Office)

<120> Método de expresión de un gen en aves transgénicas usando vector de retrovirus y aves transgénicas así obtenidas

<130> T753/TRANS-1

<150> Documento JP P2002-236089

<151> 13-08-2002

## ES 2 394 792 T3

<160> 37

5 <210> 1  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia diseñada de un cebador 5' usado para la amplificación por PCR del fragmento de región 5' del promotor Miw

15 <400> 1  
cggctagag gaattcagtg gttcg 25

20 <210> 2  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Secuencia diseñada de un cebador 3' que incorpora el sitio de reconocimiento de BamH I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento de región 5' del promotor Miw

30 <400> 2  
ccaggatccg acgttgtaaa acgacg 26

35 <210> 3  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Secuencia diseñada de un cebador 5' que incorpora el sitio de reconocimiento de Hind III en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento de región 3' del promotor Miw

45 <400> 3  
ccaaagcttg ccgcagccat tgcctttt 28

50 <210> 4  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Secuencia diseñada de un cebador 3' que incorpora el sitio de reconocimiento de Bln I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento de región 3' del promotor Miw

60 <400> 4  
atacctaggg gctggctgcg gaggaac 27

65 <210> 5  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

70 <220>  
<223> Secuencia diseñada de un cebador 5' que incorpora el sitio de reconocimiento de Nhe I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento de promotor de  $\beta$ -actina de pollo que carece del intrón

75 <400> 5  
ttagctagc tgcagctcag tgcatgcac 29

80 <210> 6  
<211> 27  
<212> ADN

## ES 2 394 792 T3

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia diseñada de un cebador 3' que incorpora el sitio de reconocimiento de Xba I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento de promotor de  $\beta$ -actina de pollo que carece del intrón

5 <400> 6  
ataatctaga aacgcagcga ctcccgc 27

10 <210> 7  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia diseñada de un cebador 5' que incorpora el sitio de reconocimiento de Xho I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento codificante de la región constante  $\kappa$  de cadena ligera de anticuerpo humano

20 <400> 7  
atcctcgaga ggccaaagta cagtg 25

<210> 8  
<211> 33  
25 <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' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento codificante de la región constante  $\kappa$  de cadena ligera de anticuerpo humano

30 <400> 8  
cccggatccc taactctc ccctgtgaa gct 33

35 <210> 9  
<211> 48  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Secuencia diseñada de un cebador 5' que incorpora el sitio de reconocimiento de Not I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento codificante de la región variable de cadena ligera de anticuerpo humano

45 <400> 9  
agcggccgct acaggtgtcc actccgacat cgtgatgacc cagtctcc 48

<210> 10  
50 <211> 34  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia diseñada de un cebador 3' que incorpora el sitio de reconocimiento de Xho I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento codificante de la región variable de cadena ligera de anticuerpo humano

55 <400> 10  
cctctcgagg atagaagtta ttcagcaggc acac 34

60 <210> 11  
<211> 32  
<212> ADN  
65 <213> Secuencia artificial

## ES 2 394 792 T3

<220>  
<223> Secuencia diseñada de un cebador 5' que incorpora el sitio de reconocimiento de Xho I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento codificante de la región constante  $\mu$  de cadena pesada de anticuerpo humano

5  
<400> 11  
acctcgagcg tggccgttgg ctgcctcgca ca 32

10  
<210> 12  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15  
<220>  
<223> Secuencia diseñada de un cebador 3' que incorpora el sitio de reconocimiento de Hind III en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento codificante de la región constante  $\mu$  de cadena pesada de anticuerpo humano

20  
<400> 12  
actaagctta cgttgtacag ggtgggtta cc 32

25  
<210> 13  
<211> 48  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30  
<220>  
<223> Secuencia diseñada de un cebador 5' que incorpora el sitio de reconocimiento de Not I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento codificante de la región variable de cadena pesada de anticuerpo humano

35  
<400> 13  
agcggccgct acaggtgtcc actccgaggt gcagctggtg gagtctgg 48

40  
<210> 14  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45  
<220>  
<223> Secuencia diseñada de un cebador 3' que incorpora el sitio de reconocimiento de Xho I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento codificante de la región variable de cadena pesada de anticuerpo humano

50  
<400> 14  
cacgctcgag gtatccgacg gggaattctc acagga 36

55  
<210> 15  
<211> 49  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

60  
<220>  
<223> Secuencia diseñada de un cebador 5' que incorpora el sitio de reconocimiento de Hind III en el extremo 5' terminal usado para la reacción de ADN polimerasa para construir el fragmento codificante de la región transmembrana del receptor de factor de crecimiento epidérmico humano

65  
<400> 15  
ccaagcttg atctccactg ggatggtggg ggccctcctc ttgctgctg 49

<210> 16  
<211> 78  
<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' terminal usado para la reacción de ADN polimerasa para construir el fragmento codificante de la región transmembrana del receptor de factor de crecimiento epidérmico humano

5 <400> 16  
**cccggatcct cagtcaaggc gccttcgcat gaagaggccg atccccaggg**  
**ccaccaccag 60**  
**cagcaagagg agggcccc 78**

<210> 17  
 <211> 31  
 <212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido diseñado usado para la mutagénesis dirigida al sitio para generar el sitio de reconocimiento de Nar I en el extremo 3' terminal del fragmento codificante de la región variable de cadena ligera de anticuerpo humano

15 <400> 17  
 tgaagacaga tggcgccgcc acagttcggt t 31

20 <210> 18  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Oligonucleótido diseñado usado para la mutagénesis dirigida al sitio para generar el sitio de reconocimiento de BamH I en el extremo 3' terminal del fragmento codificante de la región variable de cadena pesada de anticuerpo humano

30 <400> 18  
 tggggcggat gcggatcctg aggagacggt 30

35 <210> 19  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Secuencia diseñada de un cebador 5' que incorpora el sitio de reconocimiento de Not I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento codificante de la región variable de cadena ligera de anticuerpo de ratón

45 <400> 19  
 cgcgccgcc tcagggaaag ttgaagatg 30

50 <210> 20  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Secuencia diseñada de un cebador 3' que incorpora el sitio de reconocimiento de Nar I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento codificante de la región variable de cadena ligera de anticuerpo de ratón

60 <400> 20  
 cgcgccgcc acagtccggt ttattccag cttggt 36

<210> 21  
 <211> 30

## ES 2 394 792 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
5 <223> Secuencia diseñada de un cebador 5' que incorpora el sitio de reconocimiento de Not I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento codificante de la región variable de cadena pesada de anticuerpo de ratón

<400> 21  
10 cgcgcccgcg aacacggamc cctcacatg 30

<210> 22  
<211> 28  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia diseñada de un cebador 3' que incorpora el sitio de reconocimiento de BamH I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento codificante de la región variable de cadena pesada de anticuerpo de ratón

<400> 22 cggatcctgc agagacagt accagagt 28

<210> 23  
25 <211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
30 <223> Secuencia diseñada de un cebador 5' usado para la amplificación por PCR del fragmento codificante de la región constante  $\gamma$ 1 de cadena pesada de anticuerpo humano

<400> 23  
35 caagctcaa gggcccat 18

<210> 24  
<211> 19  
<212> ADN  
40 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia diseñada de un cebador 3' usado para la amplificación por PCR del fragmento codificante de la región constante  $\gamma$ 1 de cadena pesada de anticuerpo humano

<400> 24  
45 atttaccgg agacagga 19

<210> 25  
<211> 30  
<212> ADN  
50 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia diseñada de un cebador 5' que incorpora el sitio de reconocimiento de BamH I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento codificante de la región constante  $\gamma$ 1 de cadena pesada de anticuerpo humano

<400> 25  
60 ataggatccg ctgcttcaa gggcccatcg 30

<210> 26  
<211> 30  
<212> ADN  
65 <213> Secuencia artificial

<220>

## ES 2 394 792 T3

<223> Secuencia diseñada de un cebador 3' que incorpora el sitio de reconocimiento de Hind III en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento codificante de la región Fc o constante  $\gamma$ 1 de cadena pesada de anticuerpo humano

5 <400> 26  
agcaagcttt catttaccg gagacagga 30

<210> 27

<211> 28

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia diseñada de un cebador 5' que incorpora el sitio de reconocimiento de Sal I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento de promotor de  $\beta$ -actina de pollo que carece del intrón

<400> 27

acgcgtcgac gtgcatgcac gctcattg 28

20 <210> 28

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Secuencia diseñada de un cebador 3' que incorpora el sitio de reconocimiento de Sal I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento de promotor de  $\beta$ -actina de pollo que carece del intrón

<400> 28

30 acgcgtcgac aacgcagcga ctcccg 26

<210> 29

<211> 30

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia diseñada de un cebador 5' que incorpora el sitio de reconocimiento de Sal I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento codificante de la cadena ligera  $\kappa$  de anticuerpo

40

<400> 29

aatgtcgaca tgggtgccac ttctcagctc 30

<210> 30

45 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Secuencia diseñada de un cebador 3' que incorpora el sitio de reconocimiento de Sal I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento codificante de la cadena ligera  $\kappa$  de anticuerpo

<400> 30

55 ttcgtcgacc taactctc ccctgtgaa 30

<210> 31

<211> 28

<212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia diseñada de un cebador 5' que incorpora el sitio de reconocimiento de Sal I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento IRES

65 <400> 31

acgcgtcgac cgcccctc cctcccc 28

<210> 32  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diseñada de un cebador 3' que incorpora el sitio de reconocimiento de Xho I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento IRES  
 10  
 <400> 32  
 ccgctcgaga ttatcatcgt gttttcaaa ggaaaaccac gtc 43  
  
 <210> 33  
 <211> 61  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Oligonucleótido diseñado que actúa como cadena sentido en la hibridación para construir el fragmento codificante de la señal de secreción de lisozima de pollo  
  
 <400> 33  
**ctagaccatg aggtctttgc taatcttggg gctttgcttc ctgcccctgg**  
**ctgctctggg 60**  
**g 61**  
  
 25 <210> 34  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido diseñado que actúa como cadena antisentido en la hibridación para construir el fragmento codificante de la señal de secreción de lisozima de pollo  
  
 <400> 34  
**ccccagagca gccaggggca ggaagcaaag caccaagatt agcaaagacc**  
**tcatggg 57**  
 35  
  
 <210> 35  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Secuencia diseñada de un cebador 5' que incorpora el sitio de reconocimiento de Dra I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento codificante de scFv  
 45  
 <400> 35  
 gcgttaaag tgacgttga cgtccg 26  
  
 <210> 36  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 55 <223> Secuencia diseñada de un cebador 3' que incorpora el sitio de reconocimiento de BamH I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento codificante de scFv

## ES 2 394 792 T3

<400> 36  
attagatcc gcgcttaagg acggtcagg 29

5 <210> 37  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia diseñada de un cebador 5' que incorpora el sitio de reconocimiento de BamH I en el extremo 5' terminal usado para la amplificación por PCR del fragmento codificante de la región Fc  $\gamma$ 1 de cadena pesada de anticuerpo humano

15 <400> 37  
attagatcc gagcccaaat cttgtgacaa aactc 35

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Ave quimérica transgénica G0 en la que se introduce un gen de anticuerpo exógeno con un vector de retrovirus de replicación defectuosa, y produce un anticuerpo derivado del transgén en al menos una de sangre, clara de huevo y yema de huevo, en la que el contenido de dicho anticuerpo no es inferior a 20 µg/ml en sangre, o no inferior a 5 µg/ml en clara de huevo.
- 10 2. Ave quimérica transgénica G0 según la reivindicación 1, en la que una clase de una región constante del anticuerpo es IgG humana.
3. Ave quimérica transgénica G0 según la reivindicación 1, en la que una subclase de una región constante del anticuerpo es IgG1 humana.
- 15 4. Ave quimérica transgénica G0 según la reivindicación 1, en la que la región constante del anticuerpo es IgG de codorniz, IgG de pollo o IgG de ratón.
5. Ave quimérica transgénica G0 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el gen del anticuerpo está controlado por un promotor constitutivo.
- 20 6. Ave quimérica transgénica G0 según la reivindicación 5, en la que el promotor constitutivo es el promotor de beta-actina de pollo.
7. Ave quimérica transgénica G0 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el vector de retrovirus es un vector derivado del virus de la leucemia murina de Moloney.
- 25 8. Ave quimérica transgénica G0 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el vector de retrovirus es un vector de pseudotipo VSV-G.
- 30 9. Ave quimérica transgénica G0 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, siendo el ave un pollo o una codorniz.
10. Ave quimérica transgénica G0 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
- 35 11. Ave quimérica transgénica G0 según la reivindicación 10, que contiene no menos de 0,1 µg/ml del anticuerpo en yema de huevo.
12. Ave quimérica transgénica G0 según la reivindicación 11, que contiene no menos de 1 µg/ml del anticuerpo en yema de huevo.
- 40 13. Ave quimérica transgénica G0 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el anticuerpo es un anticuerpo scFv-Fc.
- 45 14. Ave quimérica transgénica G0 según la reivindicación 13, que contiene no menos de 20 µg/ml del anticuerpo en sangre.
15. Ave quimérica transgénica G0 según la reivindicación 14, que contiene no menos de 2000 µg/ml del anticuerpo en sangre.
- 50 16. Ave quimérica transgénica G0 según la reivindicación 13, que contiene no menos de 5 µg/ml del anticuerpo en clara de huevo.
17. Ave quimérica transgénica G0 según la reivindicación 16, que contiene no menos de 500 µg/ml del anticuerpo en clara de huevo.
- 55 18. Ave quimérica transgénica G0 según la reivindicación 13, que contiene no menos de 5 µg/ml del anticuerpo en yema de huevo.
19. Ave quimérica transgénica G0 según la reivindicación 18, que contiene no menos de 500 µg/ml del anticuerpo en yema de huevo.
- 60 20. Método de producción de un ave quimérica transgénica G0 que comprende incubar un huevo fértil de ave, infectar un embrión temprano tras el transcurso de 24 horas o más desde el inicio de la incubación con un vector de retrovirus de replicación defectuosa, y entonces hacer eclosionar el embrión,

en el que una secuencia génica que codifica para un gen de anticuerpo está contenida en un transgén incorporado en un vector de retrovirus de replicación defectuosa.

- 5 21. Método de producción de un ave quimérica transgénica G0 según la reivindicación 20, que comprende incubar un huevo fértil de ave, en el que se microinyecta un vector de retrovirus de replicación defectuosa en el corazón o un vaso sanguíneo formado en el embrión temprano.
- 10 22. Método de producción de un ave quimérica transgénica G0 según la reivindicación 20, que comprende incubar un huevo fértil de ave, en el que se microinyecta un vector de retrovirus de replicación defectuosa en el corazón o un vaso sanguíneo formado en el embrión temprano formado tras el transcurso de 24 horas o más desde el inicio de la incubación.
- 15 23. Método de producción de un ave quimérica transgénica G0 según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en la que se microinyecta un vector de retrovirus de replicación defectuosa que tiene el título de no menos de  $1 \times 10^7$  ufc/ml.
- 20 24. Método de producción de un ave quimérica transgénica G0 según la reivindicación 23, en la que se microinyecta un vector de retrovirus de replicación defectuosa que tiene el título de no menos de  $1 \times 10^6$  ufc/ml.
- 25 25. Método de producción de un ave quimérica transgénica G0 según la reivindicación 24, en la que se microinyecta un vector de retrovirus de replicación defectuosa que tiene el título de no menos de  $1 \times 10^9$  ufc/ml.
- 26 26. Método de producción de un ave quimérica transgénica G0 según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25, en el que el vector de retrovirus es un vector derivado del virus de la leucemia murina de Moloney.
- 27 27. Método de producción de un ave quimérica transgénica G0 según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 26, en el que el vector de retrovirus es un vector de pseudotipo VSV-G.
- 30 28. Método de producción de un ave quimérica transgénica G0 según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 27, en el que el ave es un pollo o una codorniz.
- 35 29. Método de producción de un ave quimérica transgénica G0 según las reivindicaciones 20 a 28, en el que la secuencia génica que codifica para un gen de anticuerpo está controlada por el promotor de beta-actina de pollo.
- 40 30. Método de producción de un ave quimérica transgénica G0 según las reivindicaciones 20 a 29, en el que el gen del anticuerpo es un gen de anticuerpo quimérico.
- 45 31. Método de producción de un ave quimérica transgénica G0 según las reivindicaciones 20 a 30, en el que el gen del anticuerpo es un gen de anticuerpo scFv-Fc.
- 50 32. Método de producción de un anticuerpo que comprende producir el ave quimérica transgénica G0 mediante el método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 31, y recuperar el anticuerpo de la sangre y/o un huevo de dicha ave quimérica transgénica G0.
- 55 33. Ave quimérica transgénica G0 que se produce mediante el método según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 31, en la que el contenido de una proteína derivada del transgén no es inferior a  $20 \mu\text{g/ml}$  en sangre, o no inferior a  $5 \mu\text{g/ml}$  en clara de huevo.
- 60 34. Método de producción de un ave transgénica, que comprende aparear el ave quimérica transgénica G0 según la reivindicación 33 con un ave alogénica para el tipo sexual, y entonces hacer eclosionar el huevo.
35. Método de producción de un ave transgénica según la reivindicación 34, en el que el ave alogénica para el tipo sexual es el ave transgénica G0 según la reivindicación 33 o una progenie de la misma.
36. Método de producción de un ave transgénica, que comprende aparear adicionalmente el ave transgénica G1 que se obtiene mediante el método según la reivindicación 34, y entonces hacer eclosionar el huevo.
37. Ave transgénica o una progenie de la misma, que puede obtenerse mediante el método según las reivindicaciones 34 a 36, en la que el contenido del anticuerpo no es inferior a  $20 \mu\text{g/ml}$  en sangre, o no inferior a  $5 \mu\text{g/ml}$  en clara de huevo.
38. Ave transgénica según la reivindicación 37, que es un ave transgénica G1, en la que el ave alogénica para el tipo sexual es el ave transgénica G0 según la reivindicación 33 o una progenie de la misma.

39. Método de producción de una proteína, que comprende extraer la proteína objetivo de una célula somática, sangre o un huevo del ave transgénica producida mediante el método según las reivindicaciones 34 a 36.
- 5 40. Huevo puesto por el ave transgénica según las reivindicaciones 37 ó 38, que contiene no menos de 1 mg de una proteína heterogénea derivada de un transgén.
41. Huevo según la reivindicación 40, que contiene no menos de 20 mg de una proteína heterogénea derivada de un transgén.
- 10 42. Huevo según la reivindicación 41, que contiene no menos de 100 mg de una proteína heterogénea derivada de un transgén.
43. Huevo según la reivindicación 42, que contiene no menos de 200 mg de una proteína heterogénea derivada de un transgén.

Fig. 1

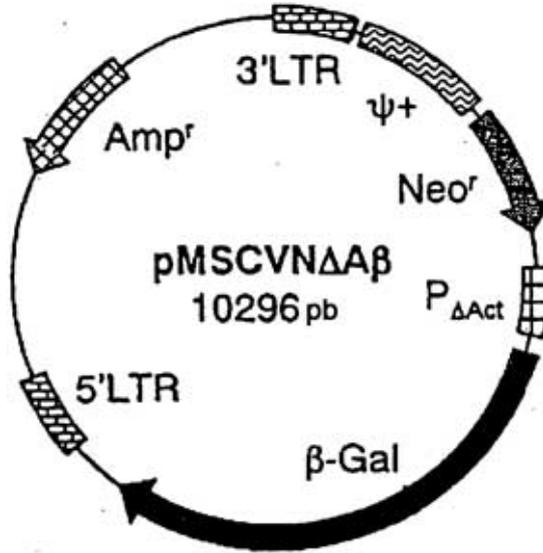


Fig. 2

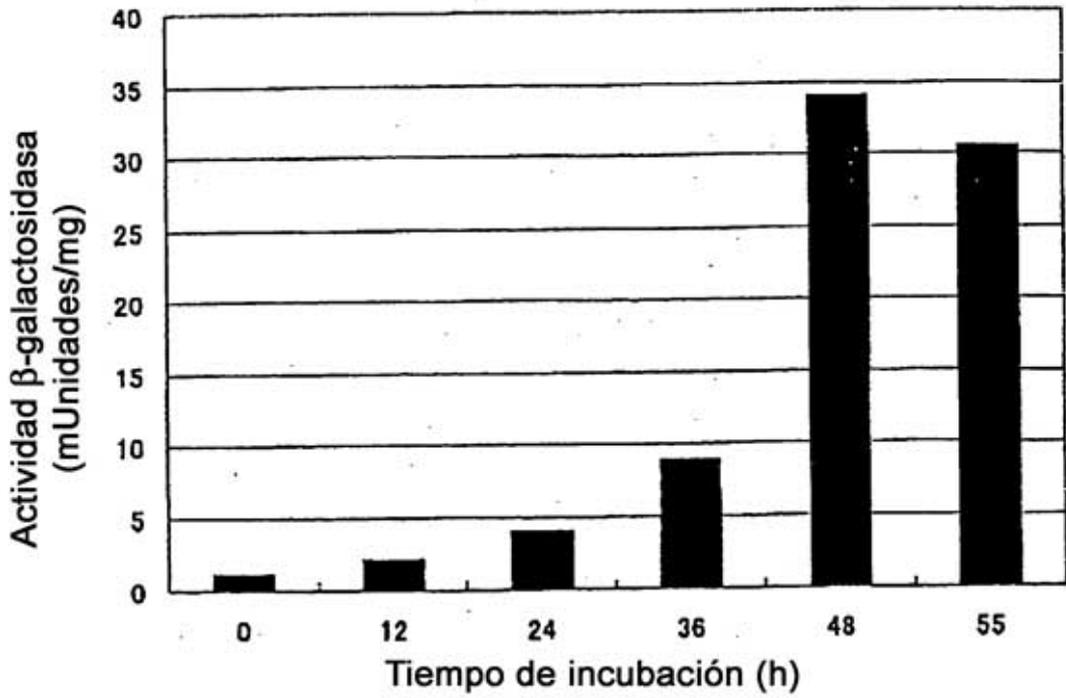


Fig. 3

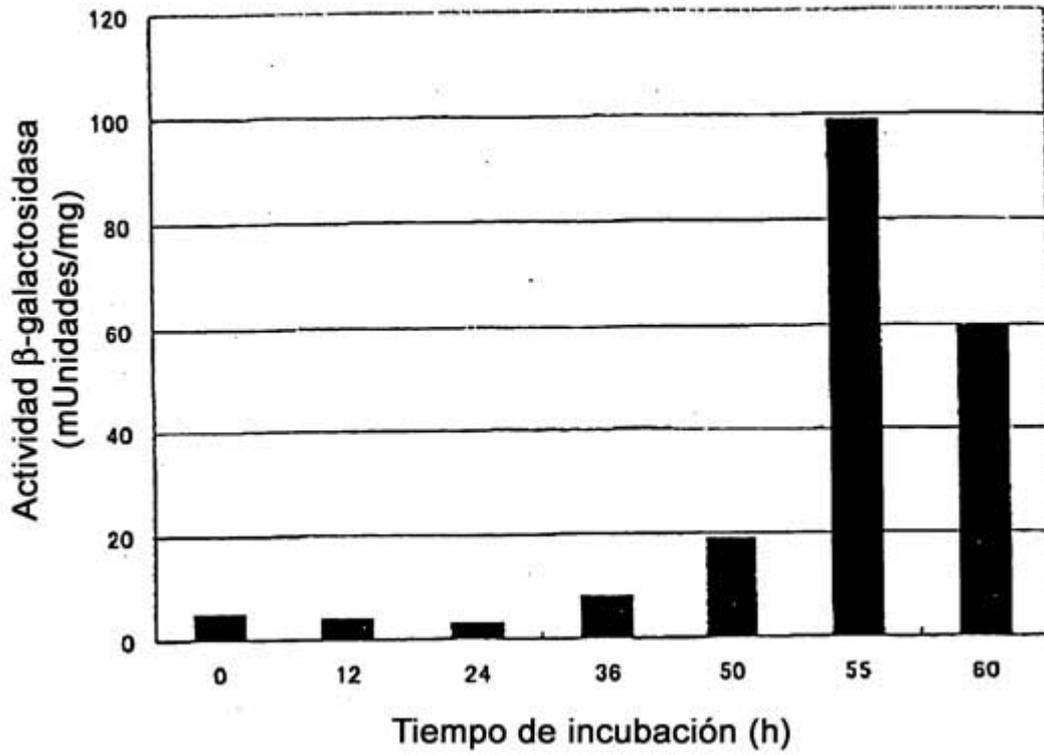


Fig. 4

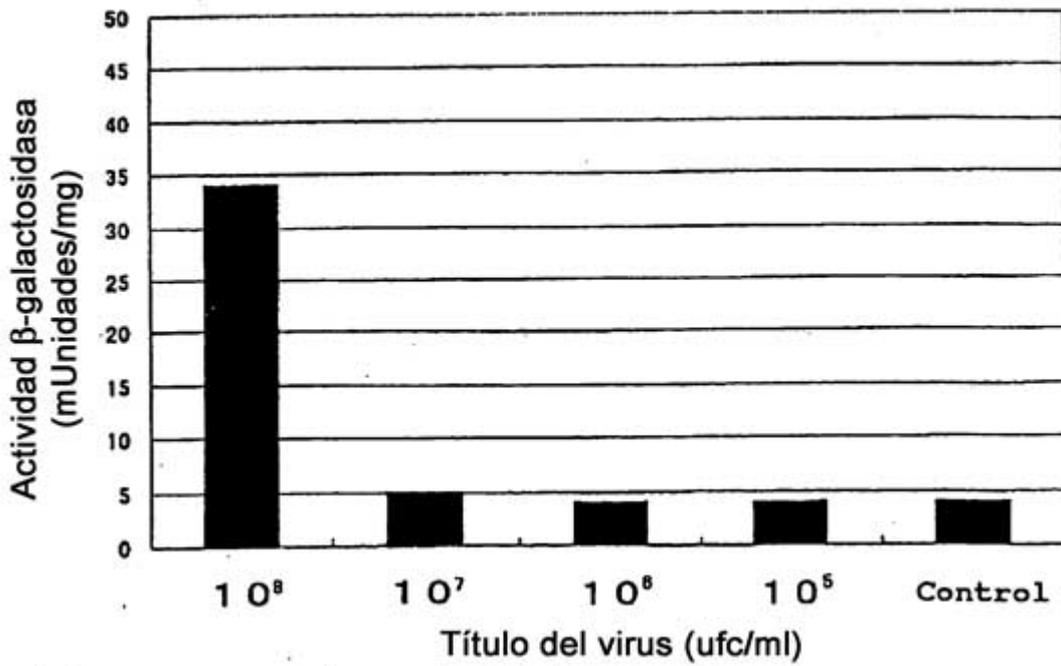


Fig. 5

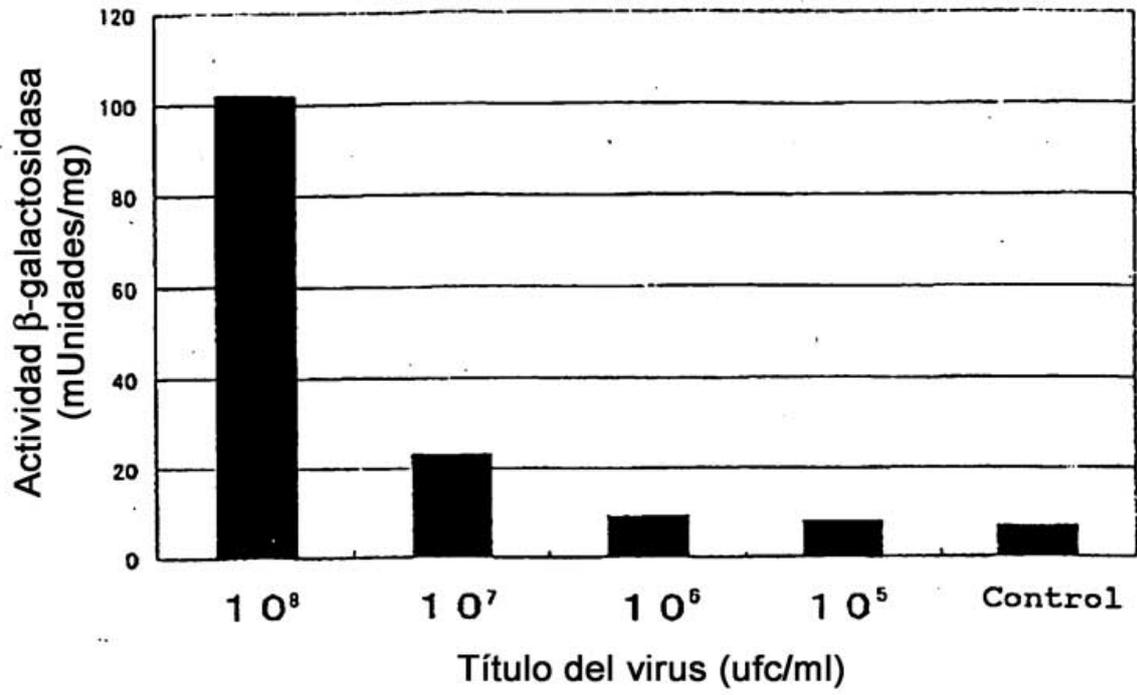


Fig. 6

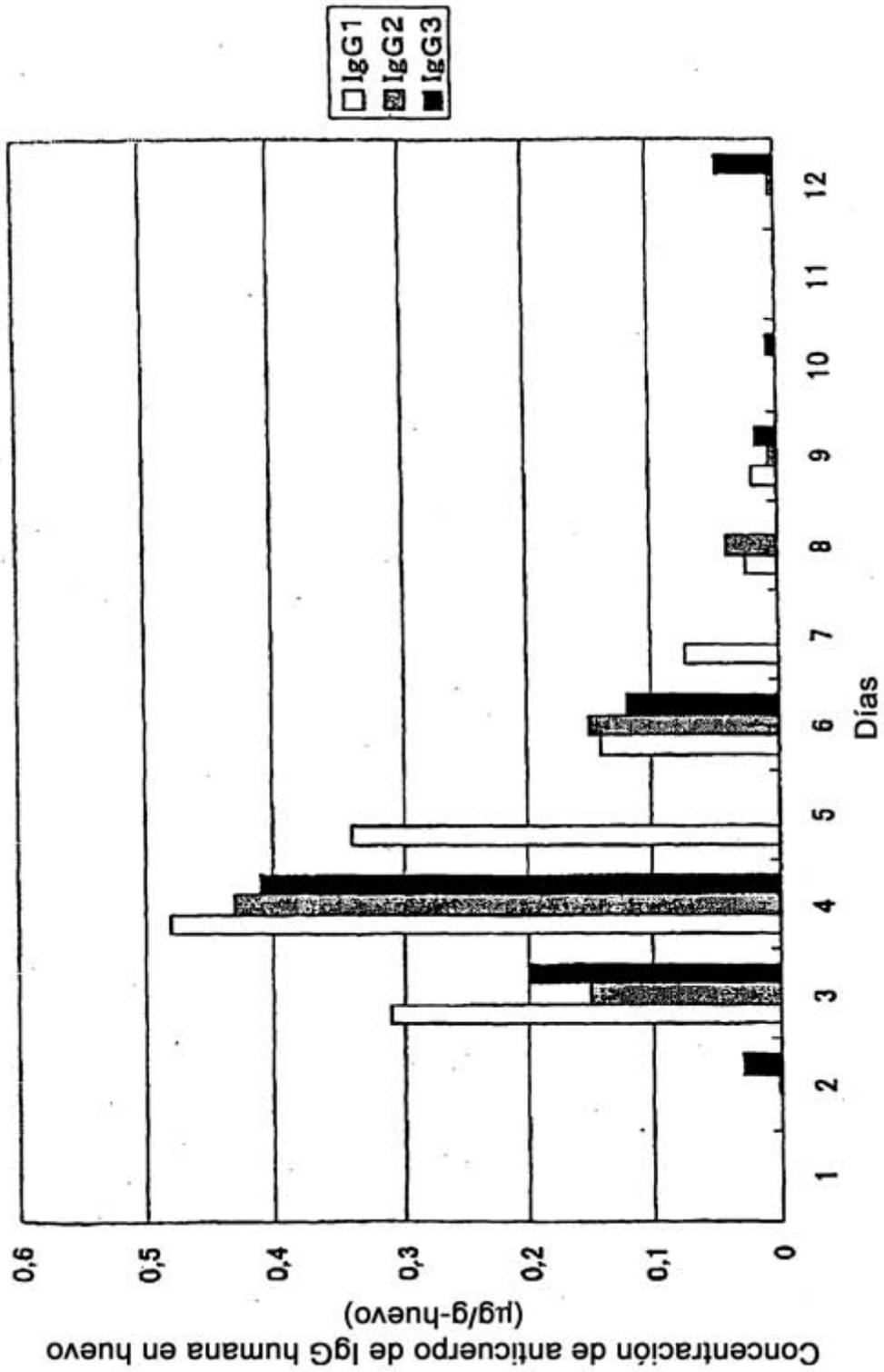


Fig. 7

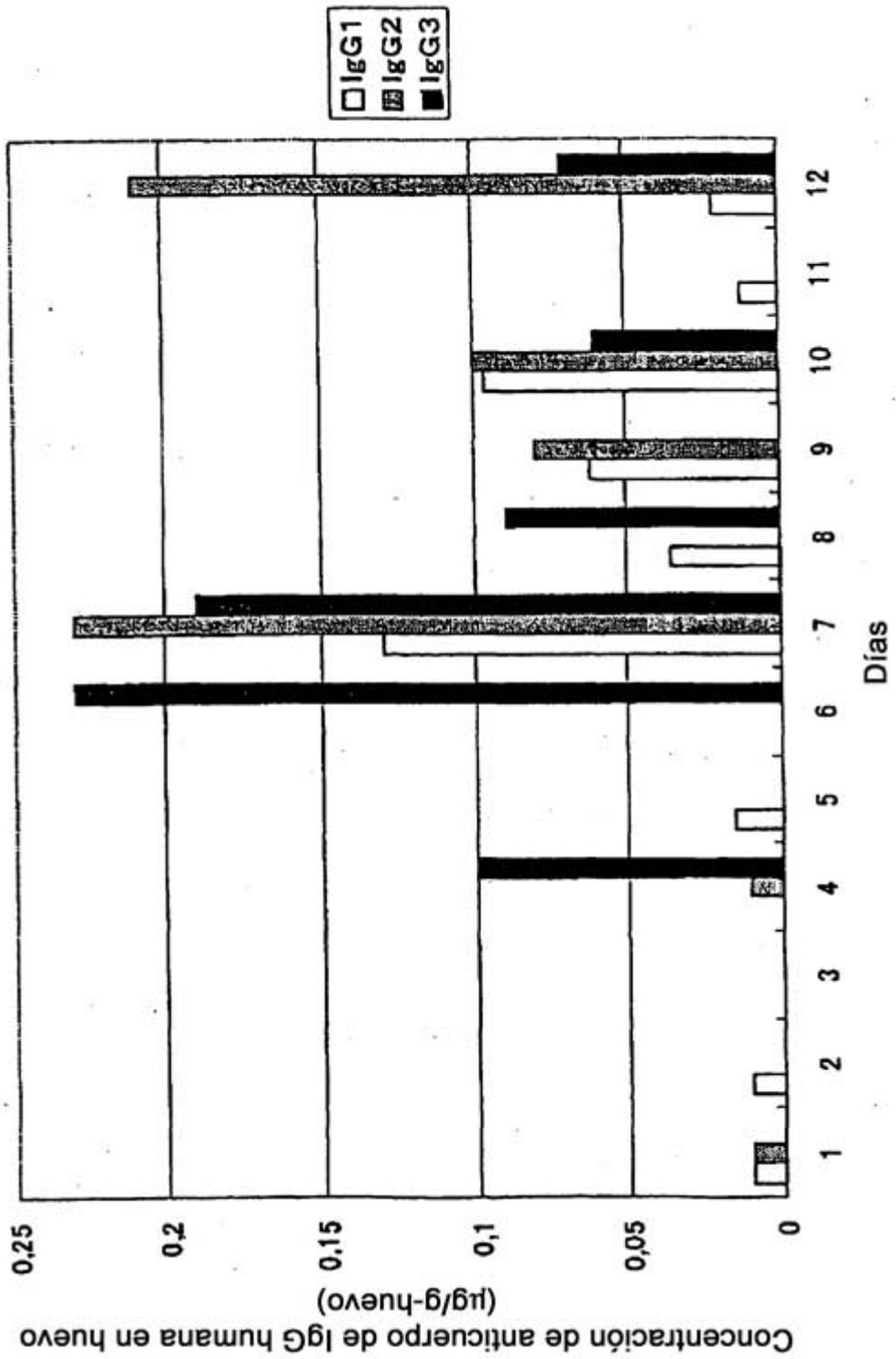


Fig. 8

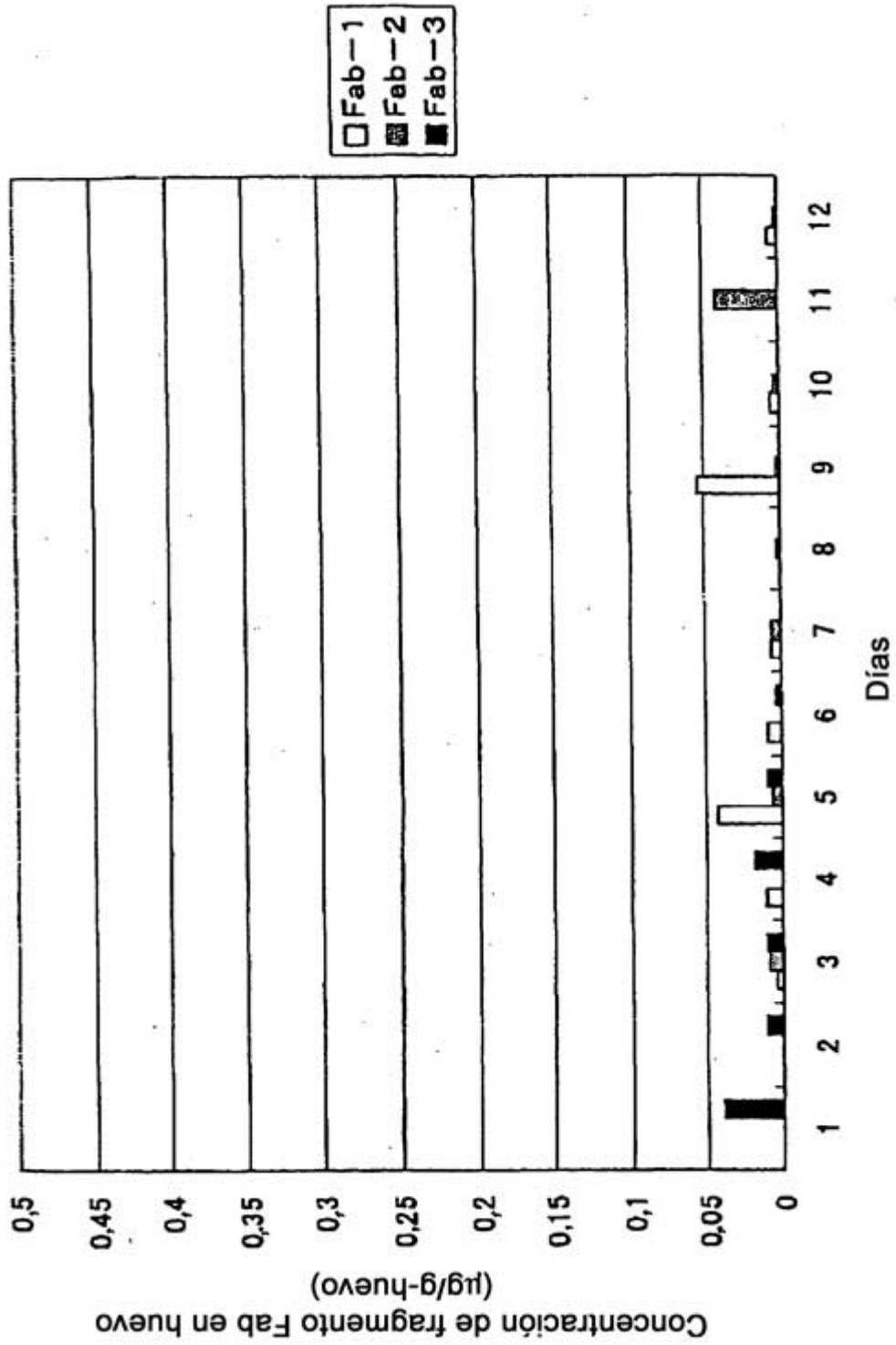


Fig. 9

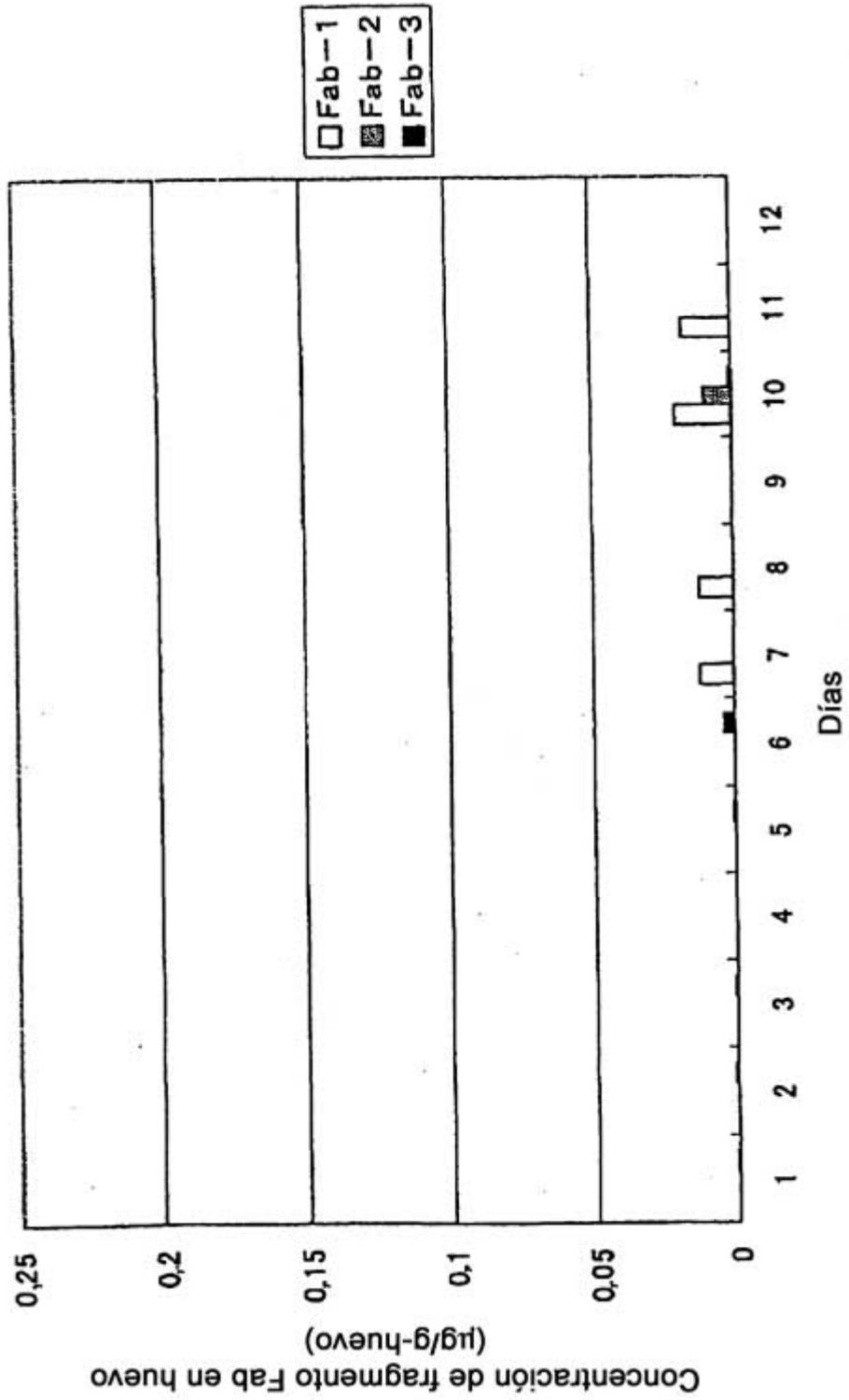


Fig. 10

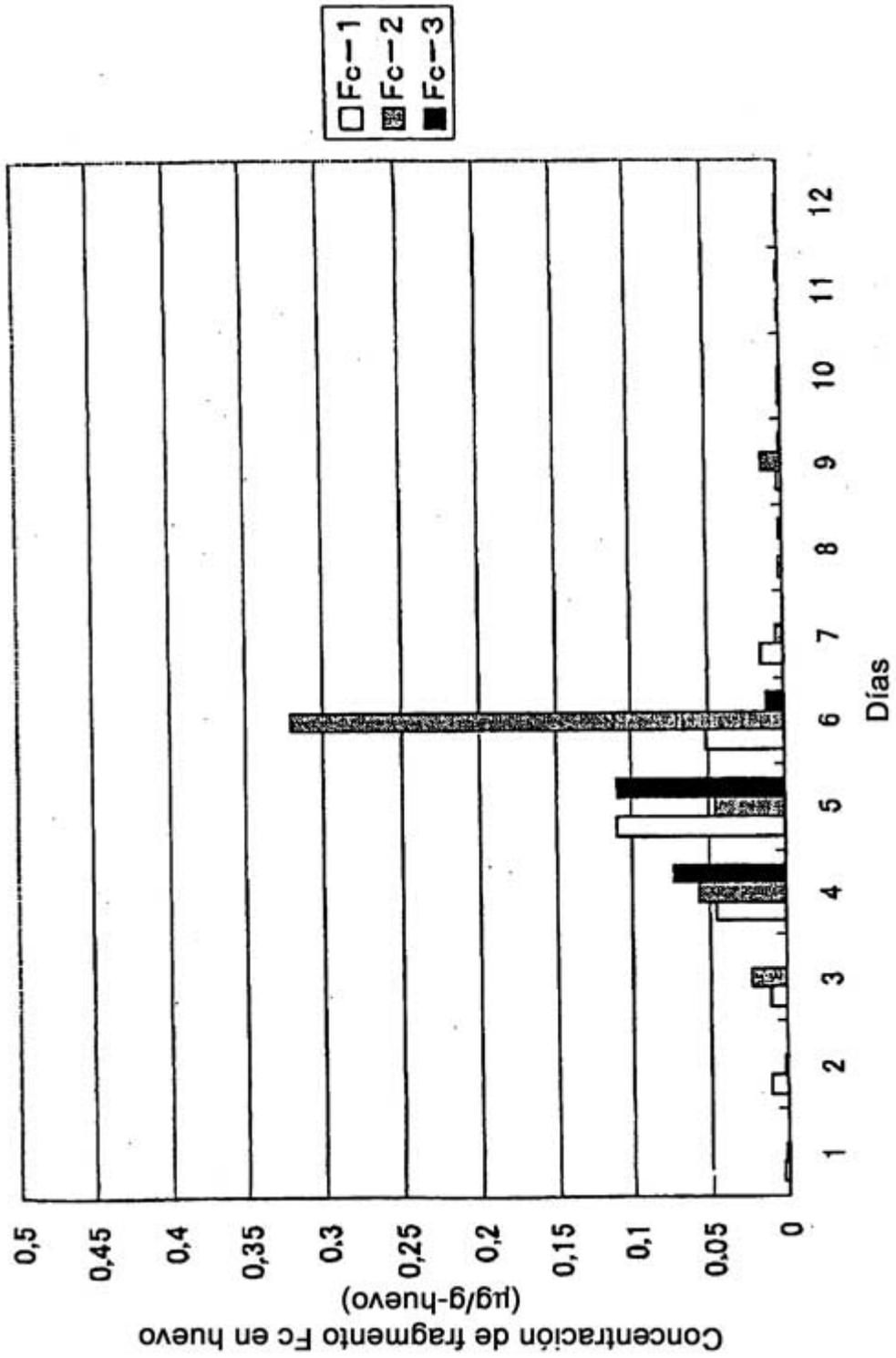


Fig. 11

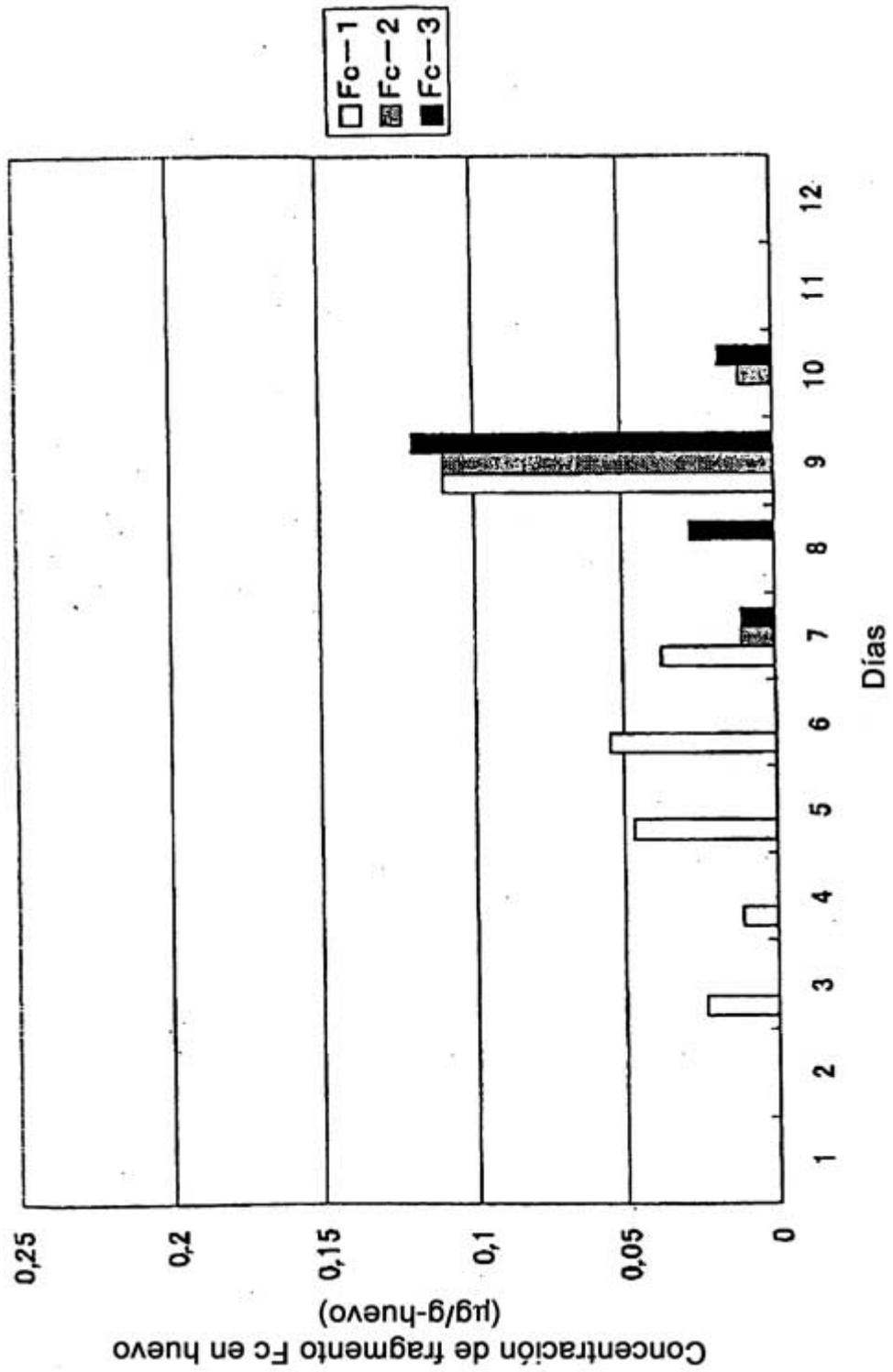
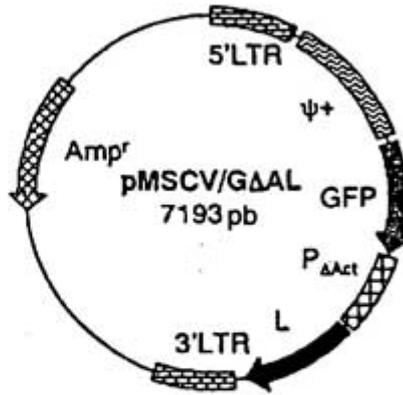
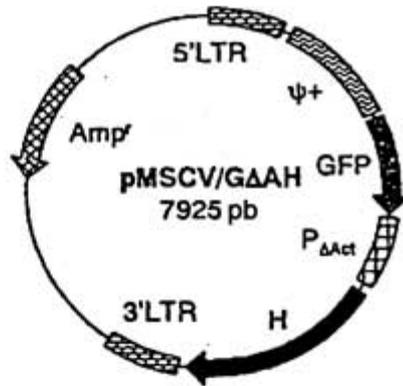


Fig. 12

(A)



(B)



(C)

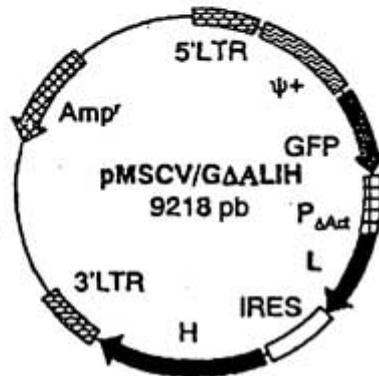


Fig. 13

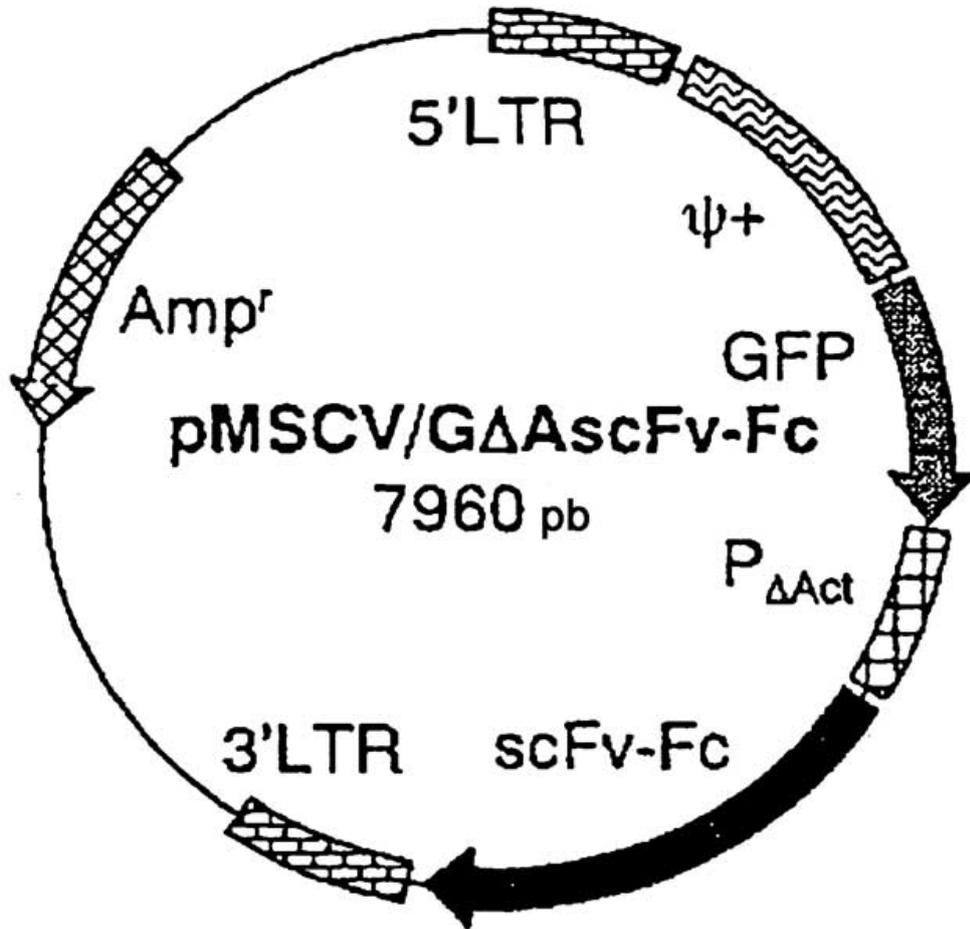


Fig. 14

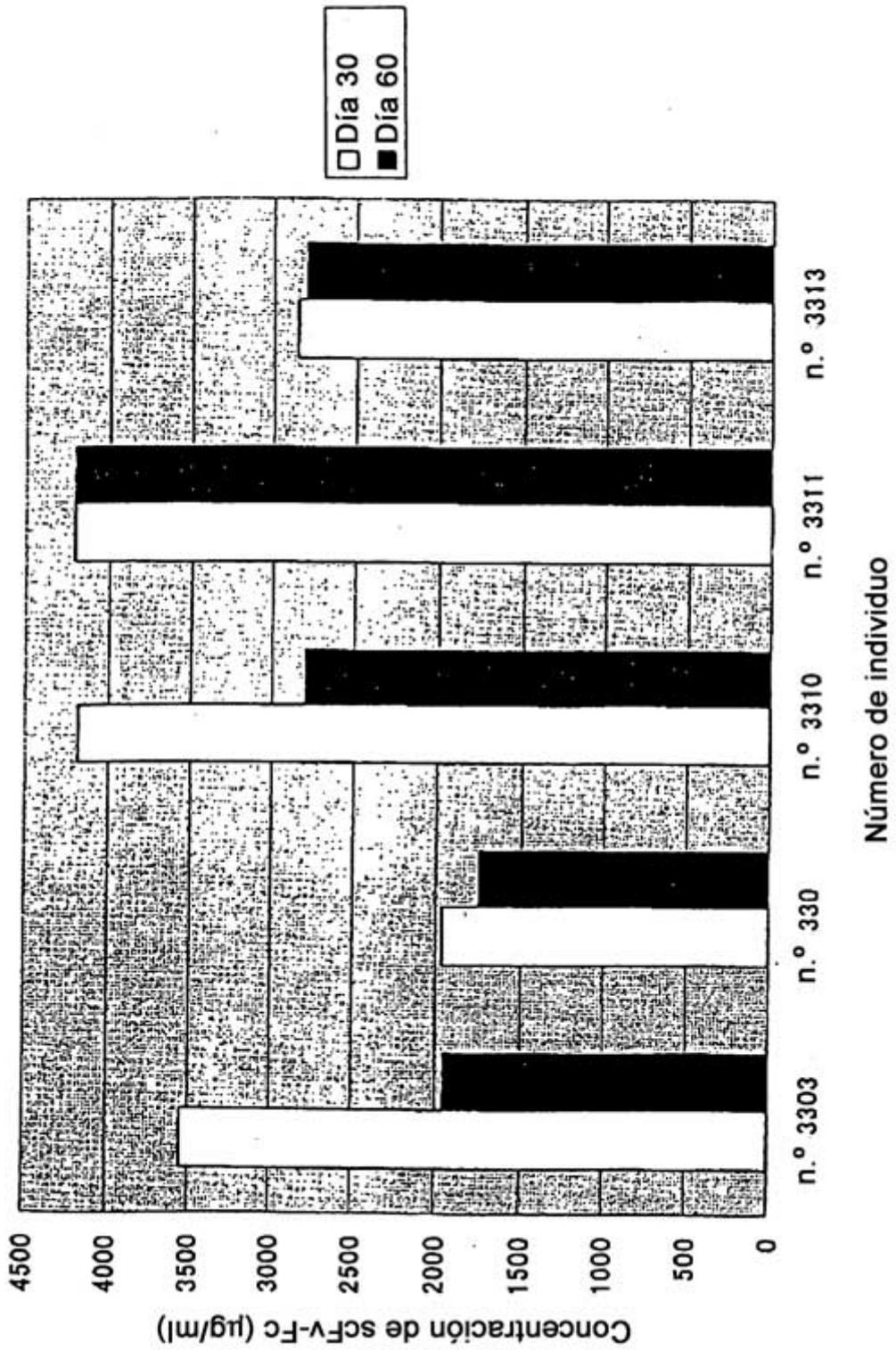


Fig. 15

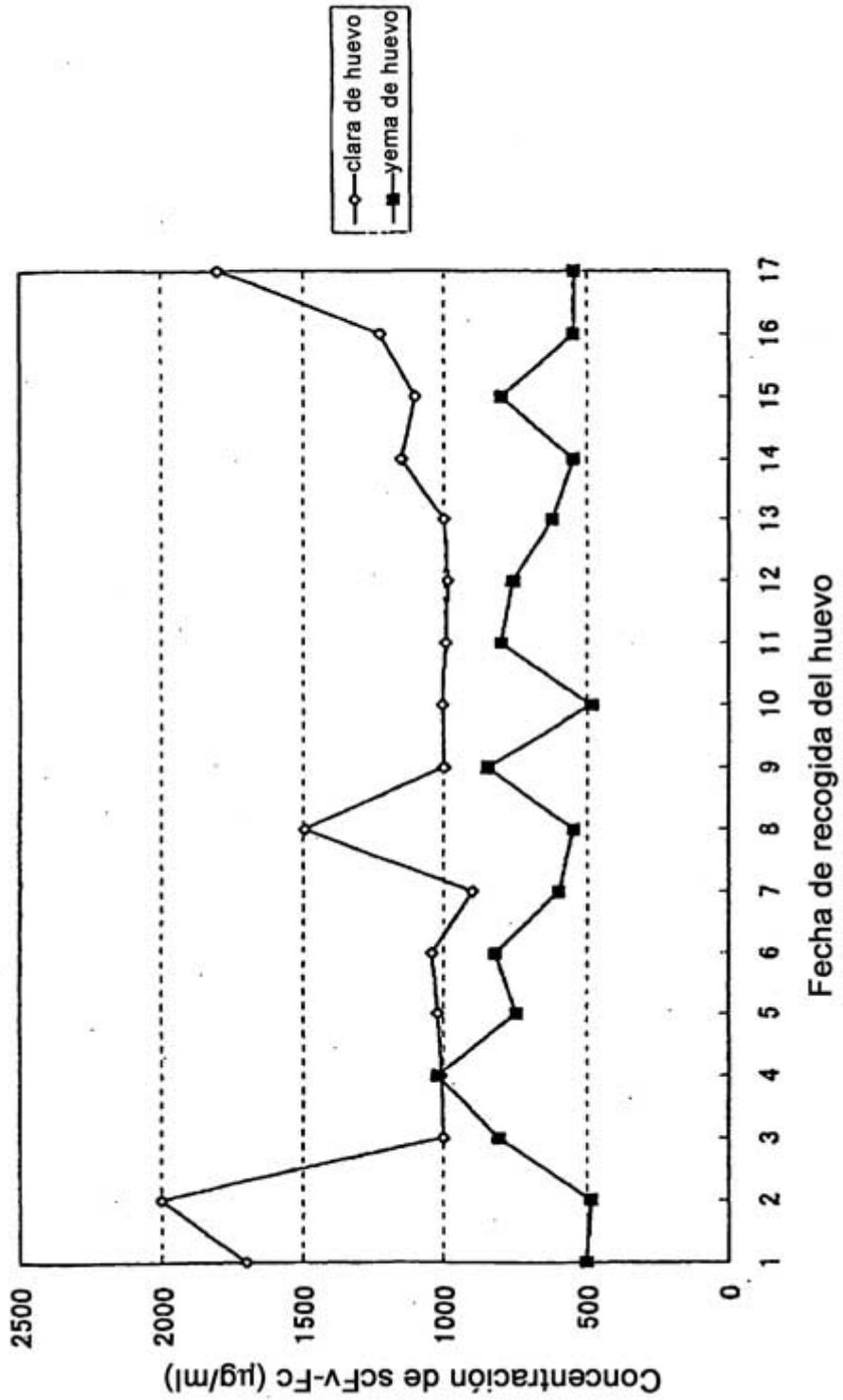


Fig. 16

