



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 347 979**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/82** (2006.01)  
**C07K 14/435** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06789294 .3**  
96 Fecha de presentación : **02.08.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1910418**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2008**

54 Título: **Supresión de la apoptosis en linfocitos B en animales transgénicos que expresan inmunoglobulina humanizada.**

30 Prioridad: **03.08.2005 US 705305 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.11.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.11.2010**

73 Titular/es:  
**THERAPEUTIC HUMAN POLYCLONALS, Inc.**  
**3431 Hillview Avenue**  
**Palo Alto, California 94304, US**

72 Inventor/es: **Platzer, Josef y**  
**Buelow, Roland**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 347 979 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).

**SUPRESIÓN DE LA APOPTOSIS EN LINFOCITOS B EN ANIMALES  
TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN INMUNOGLOBULINA HUMANIZADA**

5        **Descripción**

**Campo de la Invención**

      Esta invención está relacionada con los métodos para  
aumentar la supervivencia de linfocitos B en animales que  
han sufrido una linfopoyesis a corto plazo. Esta invención  
10    está relacionada también con los métodos para aumentar la  
supervivencia de linfocitos B en animales transgénicos que  
expresan una inmunoglobulina exógena o locus de transgén de  
una cadena de inmunoglobulina para aumentar la producción de  
inmunoglobulinas. Esta invención está relacionada además con  
15    un método para aumentar de forma selectiva la supervivencia  
de linfocitos B exógenos que expresan cualquier locus de  
transgén de inmunoglobulina en linfocitos B endógenos que no  
expresan el locus del transgén mediante expresión selectiva  
de cualquier inhibidor de la apoptosis sólo dentro de los  
20    linfocitos B exógenos que expresan la inmunoglobulina  
codificada en el transgén, pero no dentro de los linfocitos  
B que expresan inmunoglobulina endógena. Este método permite  
el aumento de expresión y producción de los productos  
codificados por el transgén en la inmunoglobulina producida  
25    de forma endógena del animal transgénico. La invención  
también proporciona un nuevo inhibidor de la apoptosis, bcl-  
2 de conejo.

**Antecedentes de la técnica**

La generación de ratones que expresan anticuerpos quiméricos humano-ratón se han descrito en Pluschke et al., Journal of Immunological Methods 215: 27-37 (1998). La generación de ratones que expresan polipéptidos de inmunoglobulina humana se han descrito en Neuberger et al., Nature 338: 350-2 (1989); Lonberg et al., Int. Rev. Immunol. 13 (1):65-93 (1995); y Bruggemann et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8(4): 455-8 (1997). La generación de ratones transgénicos utilizando un clon de BAC se ha descrito en Yang et al., Nat. Biotechnol. 15: 859-65 (1997). La generación de vacas que expresan anticuerpos humanos se ha descrito en Kuroiwa et al., Nature Biotech 20(9): 889-894 (2002).

La transgénesis en animales se ha descrito en Wall RJ, Theriogenology 57(1): 189-201 (2002). La generación de conejos transgénicos se ha descrito en Fan, J. et al., Pathol Int. 49: 583-94 (1999); y Brem et al., Mol. Reprod. Dev. 44: 56-62 (1996). La producción de pollos transgénicos se ha descrito en Etches et al., Methods in Molecular Biology 62: 433-450 (1997); y Pain et al., Cells Tissues Organs 165(3-4): 212-9 (1999); y Sherman et al., Nature Biotech 16:1050-1053 (1998).

Los conejos con expresión anómala de inmunoglobulina se han descrito en Chen et al., J. Immunol. 150: 2783-2793 (1993); y Lamoyi E, y Mage RG., J. Exp. Med. 162:1149-1160 (1985). Un pollo gamma-globulinémico se ha descrito en Frommel et al., J. Immunol. 105(1): 1-6 (1970); y Benedict et al., Adv. Exp. Med. Biol. 88(2): 197-205 (1977).

La clonación de animales a partir de células se ha descrito en T. Wakayama et al., Nature 394:369-374 (1998); J. B. Cibelli et al., Science 280:1256-1258 (1998); J.B. Cibelli et al., Nature Biotechnology 16:642-646 (1998); A.  
5 E. Schnieke et al., Science 278: 2130-2133 (1997); y K.H. Campbell et al., Nature 380: 64-66 (1996). El clonaje por transferencia nuclear de conejos se ha descrito en Stice et al., Biology of Reproduction 39: 657-664 (1988); Challah-Jacques et al., Cloning and Stem Cells 8(4):295-299 (2003).

10 La producción de animales transgénicos no humanos que expresan transloci de inmunoglobulina humana (humanizada) y la producción de anticuerpos a partir de dichos animales transgénicos se ha descrito en detalle en la Publicación PCT N°. WO 92/03918, WO 02/12437, y en la patente Estadounidense  
15 N°. 5.545.807, 5.814.318; y 5.570.429. La recombinación homóloga de huéspedes de mamífero quiméricos se muestra en la patente Estadounidense N° 5.416.260. Un método para introducir DNA en un embrión se describe en la patente Estadounidense N° 5.567.607. El mantenimiento y expansión de  
20 las células madre embrionarias se describe en la patente Estadounidense N° 5.453.357.

Las actividades de escisión de las proteínas víricas que contienen las secuencias del péptido 2A se ha descrito en Palmenberg et al., Virology 190:754-762 (1992); Ryan et  
25 al., J Gen Virol 72:2727-2732 (1991); Donnelly et al., J Gen Virol 82: 1.027-1041 (2001); Donnelly et al., J Gen Virol 82:1013-1025 (2001); Szymaczak et al., Nature Biotech 22(5):589-594 (2004).

Hasta el momento, los estudios de la contribución relativa de los mecanismos de supervivencia celular regulados por el inhibidor de la apoptosis bcl2, se han realizado principalmente en ratones. El efecto de la  
5 expresión de bcl-2 en la supervivencia de la célula se ha descrito en McDonnell et al., Cell, 57:79-88, (1989); Strasser et al., Current Topics in Microbiology and Immunology, 166:175-181, (1990); Knott et al., Hybridoma, 15 (5):365-371, (1996); Smith et al., J. Exp. Med., 191(3):475-  
10 784 (2000); Strasser et al., PNAS, 88:8661-8665, (1991) y Kumar et al., Immunology Letters, 65:153-159, (1999). El efecto de la expresión del inhibidor de la apoptosis bcl-xL en la supervivencia de las células se ha descrito en Takahashi et al., J. Exp. Med., 190(3): 399-409 (1999).

15 El mecanismo de desarrollo de los linfocitos B como una linfopoyesis B continua y a corto plazo se ha revisado en Lanning D, Osbome BA, Knight, KL., Los genes de la inmunoglobulina y la generación de repertorios de anticuerpos en vertebrados superiores: un papel clave de  
20 GALT. Biología molecular de los linfocitos B. Alt F.W., Honjo T, Nueberger, M. S., Eds. Elsevier, Londres, pág. 443 (2004); y Flajnik M.F., Análisis comparativo de los genes de inmunoglobulina: sorpresas y maravillas. Nat. Rev. Immunol. 2:688, (2002).

25 Ya que la producción de anticuerpos en animales transgénicos más grandes como conejos, pollos, ovejas y vacas se ve favorecido desde un punto de vista de rendimiento de los anticuerpos, la creación de animales

fundadores más grandes con inhibición de la apoptosis en linfocitos B que expresan mayores cantidades de productos codificados por transgenes es altamente deseable. No obstante, el desarrollo de los linfocitos B difiere

5 significativamente en las especies que padecen una linfopoyesis a corto plazo (como conejos, pollos, ovejas y vacas) en relación a los animales caracterizados por una linfopoyesis B continua, (como en los ratones). Así, no queda claro si los inhibidores de la apoptosis pueden

10 utilizarse con el mismo éxito en los animales que experimentan una linfopoyesis a corto plazo como en los animales estudiados en más detalle con linfopoyesis B continua, o, cual será el impacto de los inhibidores de la apoptosis en la producción de anticuerpos y /o afinidades de

15 anticuerpos.

#### **Resumen de la Invención**

En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido que comprende un nuevo polipéptido inhibidor de la apoptosis, a saber, el polipéptido bcl-2 de conejo con Id.

20 de Sec. N°: 5. En una realización particular, la invención proporciona una molécula quimérica que comprende el polipéptido bcl-2 de conejo de Id. de Sec. N°: 5 fusionado a una secuencia heteróloga de aminoácidos. En otra realización, la secuencia heteróloga de aminoácidos es una

25 secuencia de epítomos. En otra realización, la secuencia heteróloga de aminoácidos es una secuencia de inmunoglobulina. En aún otra realización, la secuencia de inmunoglobulina es una región Fc de una inmunoglobulina. La

presente invención también proporciona secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido bcl-2 de conejo de Id. de Sec. N°: 5. En un aspecto, la invención proporciona un vector, un casete de expresión o construcción de expresión transgénica que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido bcl-2 de conejo. En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped aislada transformada con las secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido bcl-2 de conejo de Id. de Sec. N°: 5. En otro aspecto, la invención proporciona una célula huésped aislada transformada con el vector, un casete de expresión o construcción de expresión transgénica que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido bcl-2 de conejo.

En algunos aspectos, cualquier gen inhibidor de la apoptosis puede utilizarse, por ejemplo, un inhibidor de la apoptosis seleccionado de entre el grupo que consiste en bcl-2, mutantes de la caspasa-9-DN, baculovirus p35, caspasa-9S, crmA, z-VAD-fmk, z-DEVD-fmk, B- D-fmk, z-YVAD-fmk, Bcl-xL, Mcl-1, XIAP, TIAP, KIAP, NAIP, cIAP1, cIAP2, API1, API2, API3, API4, HIAP1, HIAP2, MIHA, MIHB, MIHC, ILP, ILP-2, TLAP, survivina, livina, apollon, BRUCE, MLIAP, SODD y FLIP y variantes de los mismos. En algunas realizaciones específicas, el gen inhibidor de la apoptosis puede ser un gen bcl-2 de mamífero. En algunas realizaciones preferibles, el gen bcl-2 de mamífero se selecciona de entre el grupo que consiste en bcl-2 humano, bcl-2 de ratón y bcl2 de conejo de Id. de Sec. N°: 6. En una realización preferible, el bcl-2

es el bcl-2 de conejo de Id. de Sec. N°: 5.

En un aspecto, la invención proporciona una construcción de expresión transgénica que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un inhibidor de la apoptosis dirigida por promotor/potenciador específico de linfocito B y de esta forma, se expresa específicamente en linfocitos B.

En otro aspecto, la invención proporciona una construcción de expresión transgénica que comprende un transgén que codifica una proteína de fusión que comprende secuencias de polipéptido en el siguiente orden: a) una inmunoglobulina o cadena de inmunoglobulina; b) un péptido autoescindible; c) un inhibidor de la apoptosis; y opcionalmente, d) un sitio de escisión de proteasa entre a) y b).

La presente invención proporciona además un método para aumentar la expresión de una inmunoglobulina o cadena de inmunoglobulina en un animal transgénico que experimenta una linfopoyesis a corto plazo, que comprende introducir en el animal transgénico que experimenta una linfopoyesis a corto plazo al menos una construcción de transgén que comprende un transgén inhibidor de la apoptosis dirigido por un promotor/potenciador específico de linfocito B mediante el cual la apoptosis de los linfocitos B que llevan dicha construcción de transgén está inhibida y la producción de la inmunoglobulina o cadena de inmunoglobulina está aumentada.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para aumentar la expresión de una inmunoglobulina o



cadena de inmunoglobulina en el animal transgénico linfopoyético a corto plazo que comprende además introducir en el animal transgénico al menos un transgén adicional que codifica para una inmunoglobulina exógena o locus de transgén de cadena de inmunoglobulina. En este método, los dos transgenes pueden estar presentes en el mismo o en diferentes vectores transgénicos de expresión. En este último caso, los diferentes vectores de expresión transgénicos pueden introducirse en el animal transgénico a la vez o de forma secuencial.

La presente invención también proporciona un método para aumentar de forma selectiva la expresión de una inmunoglobulina exógena o cadena de inmunoglobulina dentro de un linfocito B exógeno de un animal transgénico no humano, que comprende introducir en el animal, una construcción transgénica que codifica una proteína de fusión que comprende secuencias de polipéptido en el siguiente orden: a) una inmunoglobulina o cadena de inmunoglobulina; b) un péptido autoescindible; c) un inhibidor de la apoptosis, y, opcionalmente; d) un sitio de escisión de proteasas entre a) y b), en el que la supervivencia del linfocito B exógeno y la producción de inmunoglobulina exógena están aumentados.

En cualquier aspecto, el sitio de escisión de la proteasa utilizado en cualquiera de las construcciones transgénicas o métodos descritos anteriormente, se selecciona entre el grupo que consiste en los sitios para las proteasas aspárticas, proteasas de cisteína,

metaloproteasas, proteasas de serina y proteasas de treonina. En las realizaciones preferibles, se utiliza el sitio de escisión de furina.

En todos los aspectos de la invención, el  
5 promotor/potenciador específico de linfocitos B puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en promotores/potenciadores de CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD40, CD72, Blimp-1, CD79b, mb-1, tirosina quinasa blk, VpreB, cadena pesada de inmunoglobulina, cadena ligera  
10 kappa de inmunoglobulina, cadena ligera lambda de inmunoglobulina y cadena J de inmunoglobulina, o modificaciones de las mismas. En realizaciones específicas, el promotor/potenciador específico de linfocitos B es el gen promotor de la cadena ligera kappa de la inmunoglobulina o  
15 una modificación del mismo.

En todos los aspectos de la invención, la(s) inmunoglobulina(s) exógenas preferibles/ locus del transgén de la cadena de inmunoglobulina es la secuencia de la cadena ligera y/o pesada de la inmunoglobulina humana/humanizada.

20 En todos los aspectos de la invención, el péptido autoescindible de la invención puede obtenerse a partir de las secuencias virales 2A/2B o tipo 2A/2B. Así, el virus puede seleccionarse entre el grupo que consiste en la familia de virus picornaviridae, la familia de virus de  
25 rinitis equina A (ERAV), la familia de virus de insectos de tipo picornavirus y de la familia de virus de rotavirus de tipo C. El virus también puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en el virus de la fiebre aftosa (FMDV),

el virus de la rinitis equina A (ERAV), y virus del asigna del Thosea (TaV).

En otro aspecto de la invención, la invención está relacionada con animales transgénicos no humanos que  
5 comprenden las construcciones transgénicas descritas anteriormente. Por ejemplo, los transgenes inhibidores de la apoptosis se introducen preferiblemente en los animales que experimentan linfopoyesis a corto plazo. Estos incluyen, pero no se limitan a, conejos, pájaros, pollos, ovejas,  
10 cabras, vacas, cerdos, caballos y burros. Estos animales con linfopoyesis a corto plazo pueden también contener transgenes, por ejemplo, que codifican un transgén de inmunoglobulina(s)/ cadena de inmunoglobulina. Por otro lado, la proteína de fusión que codifica los transgenes  
15 puede introducirse en cualquier animal no humano.

Así, en la mayoría de aspectos de la invención, a no ser que así se especifique, los animales no humanos se seleccionan entre el grupo que consiste en roedores (por ejemplo, ratones, ratas), conejos, aves (por ejemplo,  
20 pollos, pavos, patos, gansos, etc.), vacas, cerdos, ovejas, cabras, caballos, burros y otros animales de granja. En algunos aspectos de la invención, el animal transgénico no humano puede sustancialmente detener la diversificación de anticuerpos mediante la reordenación génica temprana al  
25 nacimiento o sustancialmente detener la diversificación de anticuerpos durante el primer mes de su vida. En una realización específica, el animal transgénico no humano es el conejo.

**Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 muestra un alineamiento de aminoácidos de la secuencia de polipéptidos de conejo (Id. de Sec. N°:5) con otras moléculas bcl-2 derivadas de otras especies (Id. de Sec. N°: 11-20).

Figura 2: Id. de Sec. N°: 1; un vector de inhibición de la apoptosis bcl-2 humano sintético bajo el control del kappa 1 promotor específico de linfocito B.

Figura 3: Id. de Sec. N°: 2; fragmento de DNA que codifica la proteína de fusión de la IgG M2 de conejo - péptido autoescindible F2A - bcl2 humano FRT rpsL-neo FRT.

Figura 4: Id. de Sec. N°: 3; fragmento de DNA que codifica rpsL-neo flanqueada con sitios FRT y FRT2.

Figura 5: Id. de Sec. N°: 4; fragmento de DNA que codifica la proteína de fusión con IgG M2 de conejo - péptido autoescindible F2A - bcl2 humano con codones optimizados flanqueada por sitios FRT y FRT2.

Figura 6: Id. de Sec. N°: 5; La secuencia del polipéptido bcl-2 de conejo.

Figura 7: Id. de Sec. N°: 6; fragmento de DNA que codifica la proteína de fusión con IgG M2 de conejo - péptido autoescindible F2A - bcl2 humano con codones optimizados.

Figura 8: Id. de Sec. N°: 7; fragmento de DNA que codifica la proteína de fusión con IgM M2 de conejo - péptido autoescindible F2A - bcl2 humano.

Figura 9: Id. de Sec. N°: 8; fragmento de DNA que codifica la proteína de fusión con IgG M2 de conejo -

péptido autoescindible F2A - bcl2 humano con codones optimizados.

Figura 10: Id. de Sec. N°: 9; fragmento de DNA que codifica la proteína de fusión con IgM M2 de conejo - diana  
5 de escisión de la furina - péptido autoescindible F2A - bcl2 humano.

Figura 11: Id. de Sec. N°: 10; fragmento de DNA que codifica la proteína de fusión con IgG M2 de conejo - diana de escisión de la furina - péptido autoescindible F2A - bcl2  
10 humano con codones optimizados.

### **Descripción detallada de la invención**

#### **Definiciones**

A no ser que se defina de otra manera, los términos técnicos y científicos utilizados aquí poseen el mismo  
15 significado que el que se entiende normalmente por un experto en la materia a la que esta invención pertenece. Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2<sup>a</sup> ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994), y March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and  
20 Structure 4<sup>a</sup> ed., John Wiley & Sons (New York, NY 1992), proporcionan al experto en la materia una guía general para muchos de los términos utilizados en la presente solicitud.

Un experto en la materia reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este  
25 documento, que pueden utilizarse en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no está limitada a los métodos y materiales descritos. Para la presente invención, se definen a continuación los siguientes

términos.

Se define como "linfocitos B" el linaje de células B que son capaces de experimentar una reordenación de los segmentos génicos de inmunoglobulina y que expresan genes de  
5 inmunoglobulina en alguna fase de su ciclo de vida. Estas células incluyen, pero no se limitan a, pro-linfocitos B tempranos, pro-linfocitos B tardíos, pre-linfocitos B grandes, pre-linfocitos B pequeños, linfocitos B inmaduros, linfocitos B maduros, linfocitos B de memoria, células  
10 plasmáticas, etc.

Como "inhibidor de la apoptosis" se refiere a una molécula o sustancia cuya presencia o expresión proporciona una reducción de la apoptosis en las células diana, independientemente del mecanismo subyacente.  
15 Preferiblemente, el inhibidor de la apoptosis reduce la apoptosis de una célula diana en al menos alrededor del 50%, o al menos alrededor del 60%, o al menos alrededor del 70%, o al menos alrededor del 75%, o al menos alrededor del 80%, o al menos alrededor del 85%, o al menos alrededor del 90%,  
20 o al menos alrededor del 95% en relación a la apoptosis en ausencia del inhibidor.

El término "translocus o locus o segmento del gen humano de Ig " tal como se utiliza en el presente documento incluye ambas secuencias naturales de un locus génico o  
25 segmento del mismo de Ig humana, formas degeneradas de secuencias naturales de un locus génico o segmento del mismo de Ig humana, así como de secuencias sintéticas que codifican una secuencia de polipéptido sustancialmente

idéntica a un polipéptido codificado por una secuencia natural de un locus génico o segmento del mismo de Ig humana. En este contexto, por "sustancialmente" se entiende que el grado de identidad en la secuencia de aminoácidos es

5 preferiblemente de al menos alrededor del 85%-95%, o más preferiblemente al menos alrededor del 90%-95%, o aún más preferiblemente al menos alrededor del 95%, o lo más preferible al menos alrededor del 98%. En un realización particular, el segmento génico de Ig humana hace que la

10 molécula de inmunoglobulina no sea inmunogénica en humanos. Aquí, los términos "locus de la cadena ligera y/o pesada de la inmunoglobulina (Ig) humana (humanizada)" o "locus Ig humano o humanizado" se utilizan indistintamente.

Los términos "anticuerpo humano" y "inmunoglobulina

15 humana " se utilizan en este documento para referirse a anticuerpos y moléculas de inmunoglobulina que comprende secuencias completamente humanas.

Los términos "anticuerpo humanizado" y "inmunoglobulina humanizada" tal como se utiliza en el presente documento,

20 indican una molécula de inmunoglobulina que comprende al menos una porción de una secuencia de polipéptido de inmunoglobulina humana (o una secuencia de polipéptido codificada por un segmento génico de inmunoglobulina humana). Las moléculas de inmunoglobulina humanizada de la

25 presente invención pueden aislarse a partir de un animal transgénico no humano diseñado para producir moléculas de inmunoglobulina humanizada. Dichas moléculas de inmunoglobulina humanizada son menos inmunogénicas a los

primates, especialmente a humanos, en relación a las moléculas de inmunoglobulina no humanizadas preparadas a partir del animal o preparadas a partir de células derivadas del animal. Las inmunoglobulinas o anticuerpos humanizados

5 incluyen inmunoglobulinas (Ig) y anticuerpos que están además diversificados a través de la conversión génica e hipermutaciones somáticas en los animales con conversión génica. Dichas Ig o anticuerpos humanizados no son "humanos" ya que no están hechos de forma natural por humanos (ya que

10 los humanos no diversifican su repertorio de anticuerpos a través de la conversión génica) y aún, las Ig o anticuerpos humanizados no son inmunogénicos a los humanos ya que poseen secuencias de Ig humana en su estructura.

Los "transgenes o construcciones transgénicas" son

15 fragmentos de DNA con secuencias que codifican proteínas naturales o sintéticas que normalmente no se encuentran en el animal o células del animal. El término "construcción transgénica" se utiliza en este documento para referirse a una molécula de polinucleótido, que contiene un "gen de

20 interés" estructural y otras secuencias que facilitan la transferencia del gen. Esta invención está relacionada con al menos dos construcciones transgénicas: 1) el transgén del inhibidor de la apoptosis bcl-2 de conejo dirigido por un promotor específico de linfocito B , y, 2) la construcción

25 transgénica con el locus de la Ig humana - péptido autoescindible - inhibidor de la apoptosis.

Un "vector de expresión o construcción de expresión transgénico" se refiere a fragmentos de DNA que codifican, a



parte de una o varias construcciones transgénicas de la invención, otras secuencias reguladoras de DNA necesarias para la expresión temporal, específica de célula, o potenciada de los transgenes de interés, dentro de las  
5 células específicas del animal transgénico no humano.

El "transgén o construcción transgénica con el locus de la Ig humana (humanizada) - péptido autoescindible - inhibidor de la apoptosis" se refiere a construcciones transgénicas que se transcriben en un mRNA sencillo, que se  
10 traduce en dos polipéptidos, a saber, la cadena de inmunoglobulina humana (humanizada) y un inhibidor de la apoptosis, debido a los mecanismos autoescindibles descritos más adelante.

El término "péptido autoescindible" tal como se utiliza  
15 en el presente documento se refiere a una secuencia de péptido que está asociado con una actividad de escisión que ocurre entre dos residuos de aminoácidos dentro de la propia secuencia del péptido. Por ejemplo, en el péptido 2A/2B o en los péptidos similares a 2A/2B, la escisión sucede entre el  
20 residuo de glicina en el péptido 2A y un residuo de prolina en el péptido 2B. Esto sucede a través de un "mecanismo de escape ribosomal" durante la traducción en el que, la formación de enlaces en el péptido normal entre el residuo glicina 2A y el residuo prolina 2B del péptido 2A12B se ve  
25 impedida, sin afectar a la traducción del resto del péptido 2B. Dichos mecanismos de escape ribosomales son bien conocidos en la materia y se conocen por ser utilizados por varios virus para la expresión de varias proteínas

codificadas por un mensajero de RNA sencillo.

Los términos "linfocitos B que expresan Ig (inmunoglobulina) endógena" y "linfocitos B endógenos" se utilizan indistintamente, y se refieren a aquellos  
5 linfocitos B que expresan el locus de inmunoglobulina endógena del animal.

Los términos "linfocitos B que expresan Ig (inmunoglobulina) exógena" y "linfocitos B exógenos" se refieren a aquellos linfocitos B de un animal no humano que  
10 experimentan una reordenación productiva de un translocus de Ig humana (humanizada) exógena introducida en dichos linfocitos B. El locus de Ig humano (humanizado) se introduce en dichos linfocitos B como una construcción de expresión separada o como parte de la misma construcción de  
15 expresión que codifican también el inhibidor de la apoptosis. La reordenación productiva del locus de Ig humano (humanizado) resulta en la expresión de la Ig humana (humanizada) y el inhibidor de la apoptosis codificado en el transgén. Como resultado, la apoptosis en los linfocitos B  
20 que expresan inmunoglobulina exógena se ve inhibida y aumenta la supervivencia celular.

Por "expresión del gen inhibidor de la apoptosis específico de linfocito B" se entiende, la expresión del producto del gen inhibidor de la apoptosis preferiblemente  
25 en las células inmunitarias, más preferiblemente en los linfocitos B. La expresión específica del gen inhibidor de la apoptosis en las células inmunitarias o linfocitos B se logra utilizando un promotor inmuno específico o

preferiblemente, utilizando un promotor específico de linfocitos B que dirige la expresión del gen inhibidor de la apoptosis.

Por "expresión selectiva del inhibidor de la apoptosis" se entiende, la expresión del producto del gen inhibidor de la apoptosis preferiblemente en los linfocitos B exógenos en lugar de linfocitos B endógenos que expresan las inmunoglobulinas nativas del animal transgénico. Preferiblemente, el nivel de expresión del inhibidor de la apoptosis es de al menos alrededor de dos veces, más preferiblemente al menos alrededor de cinco veces, aún más preferiblemente al menos alrededor de diez veces, lo más preferible en al menos alrededor de 50 veces más expresión en los linfocitos B exógenos en comparación con la expresión en los linfocitos B endógenos.

Los "anticuerpos" (Ab) y las "inmunoglobulinas" (Ig) son glicoproteínas que poseen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos presentan una especificidad de unión para un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen ambos anticuerpos y otras moléculas similares a anticuerpos que carecen de especificidad de antígeno. El término "anticuerpo" se utiliza en este documento en el sentido más amplio y cubre específicamente, sin limitación, a anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo siempre y cuando presenten la especificidad

deseada.

El término "segmento génico de Ig" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a segmentos de DNA que codifican varias porciones de una molécula de Ig, que están  
5 presentes en la línea germinal de animales y humanos, y que se reúnen en los linfocitos B para formar genes de Ig reordenados. Así, los segmentos génicos de Ig tal como se utilizan en el presente documento incluye los segmentos génicos V, segmentos génicos D, segmentos génicos J y  
10 segmentos génicos de la región C. La reordenación funcional de los segmentos VDJ o VJ resulta en la expresión de la cadena ligera o pesada de la inmunoglobulina.

Los términos "diversidad de anticuerpo" y "repertorio de anticuerpo " se utilizan de forma intercambiable, y se  
15 refieren al total de todas las especificidades de anticuerpo que un organismo es capaz de expresar.

Un locus de Ig que posee la capacidad de experimentar una reordenación génica y conversión génica también es referido en este documento como un locus de Ig "funcional",  
20 y los anticuerpos con una diversidad generada mediante un locus de Ig funcional también son referidos en este documento como anticuerpos "funcionales" o un repertorio de anticuerpos "funcionales".

El término "anticuerpo monoclonal" se utiliza para  
25 referirse a una molécula de anticuerpo sintetizada mediante un clon único de linfocitos B.

El término "anticuerpo policlonal" se utiliza para referirse a una población de moléculas de anticuerpo

sintetizadas mediante una población de linfocitos B.

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se utilizan indistintamente, y, cuando se utiliza en singular o plural, generalmente se refieren a cualquier

5 polribonucleótido o polidesoxiribonucleótido, que puede ser RNA o DNA no modificado o RNA o DNA modificado. Así, por ejemplo, los polinucleótidos definidos en este documento incluyen, sin limitación, DNA de cadena doble o sencilla, DNA que incluye regiones de cadena doble o sencilla, RNA de

10 cadena doble o sencilla, y RNA que incluye regiones de cadena doble o sencilla, moléculas híbridas que comprende DNA y RNA que pueden ser de cadena sencilla o, de forma más habitual, de cadena doble o incluye regiones de cadena doble o sencilla. Además, el término "polinucleótido" tal como se

15 utiliza en el presente documento se refiere a regiones de cadena triple que comprende RNA o DNA o ambos RNA y DNA. Las cadenas en dichas regiones pueden ser desde la misma molécula o de diferentes moléculas. Las regiones pueden incluir todas de entre una o más moléculas, pero más

20 normalmente involucran sólo una región de alguna de las moléculas. Una de las moléculas de una región de triple hélice a menudo es un oligonucleótido. El término "polinucleótido" específicamente incluye cDNA. El término incluye DNA (que incluye cDNA) y RNA que contienen una o más

25 bases modificadas. Así, los DNA o RNA con estructuras modificadas para la estabilidad o por otras razones son "polinucleótidos" tal como el término pretende que lo sea en este documento. Además, los DNA o RNA que comprenden bases

atípicas, como la inosina, o bases modificadas, como las bases tritiadas, se incluyen dentro del término "polinucleótidos" tal como se define en este documento. En general, el término "polinucleótido" abarca todas las formas  
5 químicamente, enzimáticamente y/o metabólicamente modificadas de polinucleótidos no modificados, así como las formas químicas de DNA y RNA característicos de virus y células, que incluye células simples y complejas.

El término "animal (transgénico) no humano" tal como se  
10 utiliza en el presente documento incluye, pero no se limita a, mamíferos como, por ejemplo, primates no humanos, roedores (por ejemplo, ratones y ratas), mamíferos no roedores, como, por ejemplo, conejos, cerdos, ovejas, cabras, vacas, cerdos, caballos y burros, y aves (por  
15 ejemplo, pollos, pavos, patos, gansos y similares). El término " animal no primate" tal como se utiliza en el presente documento incluye, pero no se limita a, mamíferos diferentes de primates, que incluye pero no se limita a los mamíferos específicamente enumerados anteriormente.

20 La frase "animales que crean diversidad de anticuerpos sustancialmente mediante conversión génica y/o hipermutación somática para crear repertorios de anticuerpos primarios" o "animales de conversión génica" y sus equivalentes gramaticales, se utilizan para referirse a dichos animales  
25 en que el mecanismo predominante de la diversificación de anticuerpos es la conversión génica y/o hipermutación a diferencia de la reordenación génica. Dichos animales incluyen, pero no se limitan a, conejos, aves (por ejemplo,

pollos, pavos, patos, gansos y similares), vacas y cerdos. Los animales no humanos particularmente preferibles son los conejos y los pollos.

Por animales que "detienen la reordenación génica de anticuerpos temprana al nacimiento" se refiere a aquellos animales en los que la reordenación de los genes de inmunoglobulina se detiene normalmente durante el primer mes de vida. Ejemplos de dichos animales son, sin ser limitantes, conejos, aves (por ejemplo, pollos), ovejas, cabras, bovinos, cerdos y caballos .

#### **Descripción detallada**

Esta invención, al menos en parte, se basa en el reconocimiento de que la producción de inmunoglobulina (que incluye la cadena de inmunoglobulinas) en un animal transgénico no humano que experimenta linfopoyesis a corto plazo puede aumentarse significativamente por la expresión de un inhibidor de la apoptosis en los linfocitos B del animal. Como resultado, la supervivencia de los linfocitos B se ve aumentada y la producción de inmunoglobulina aumenta.

La invención se basa además en la identificación de un nuevo inhibidor de la apoptosis, bcl-2 de conejo. De acuerdo con esto, en una realización, la invención está relacionada con métodos para aumentar la expresión de inmunoglobulina en animales transgénicos no humanos mediante la sobreexpresión de bcl-2 de conejo en los linfocitos B del animal, utilizando un promotor específico de linfocitos B , aumentando así la supervivencia de los linfocitos B.

Esta invención está relacionada también con un método

para aumentar de forma selectiva la supervivencia de linfocitos B exógenos, es decir, linfocitos B que expresan un locus transgénico de inmunoglobulina, por encima de la supervivencia de los linfocitos B endógenos que no expresan dicho locus transgénico en animales no humanos, que experimentan linfopoyesis a corto plazo. La selectividad se logra acoplando la expresión de inmunoglobulina exógena con la expresión del inhibidor de la apoptosis. En los linfocitos B endógenos, el inhibidor de la apoptosis no se expresa y por lo tanto, no se inhibe la apoptosis. Dicha expresión selectiva resulta en producción preferente de la expresión de inmunoglobulina transgénica por encima de la inmunoglobulina producida de forma endógena del animal transgénico.

La sobreexpresión de inhibidores de la apoptosis bcl-2 (diferentes de la secuencia de conejo descrita en primer lugar en este documento) se ha estudiado principalmente en ratones que muestran respuestas de anticuerpo amplificadas y prolongadas a la inmunización debido a un gran exceso de linfocitos B, células secretoras de inmunoglobulina, e inmunoglobulinas séricas, atribuible a un aumento de la longevidad del linaje de linfocitos B y linfocitos B de memoria específicos de antígeno; McDonnell et al., Cell, 57:79-88, (1989); Strasser et al., Current Topics in Microbiology and Immunology, 166:175-181, (1990); Knott et al., Hybridoma, 15 (5):365-371, (1996); Smith et al., J. Exp. Med., 191(3):475-784 (2000); Strasser et al., PNAS, 88:8661-8665, (1991) y Kumar et al., Immunology Letters,



65:153-159, (1999).

La apoptosis de poblaciones diana de linfocitos B ocurre de forma rutinaria durante el desarrollo de los linfocitos B. Se han identificado dos estrategias  
5 principales para el desarrollo de linfocitos B a través del estudio de diferentes especies: linfopoyesis B continua, como en ratones y humanos, y linfopoyesis B a corto plazo seguida de expansión en tejido linfoide asociado a los intestinos (GALT), como en pollos, conejos, ovejas y vacas  
10 (revisado por Lanning D, Osborne BA, Knight, KL., Immunoglobuline genes and generation of antibody repertoires in higher vertebrates: a key role of GALT. Molecular Biology of B cells. Alt F.W., Honjo T, Nueberger, M. S., Eds. Elsevier London, p 443 (2004); y Flajnik M.F., Comparative  
15 analysis of immunoglobuline genes: surprises and portents. Nat. Rev. Immunol. 2:688, (2002)).

En especies en las que sucede la linfopoyesis B continua, los linfocitos B se desarrollan principalmente en la médula ósea y el hígado fetal, y los genes de  
20 inmunoglobulina se diversifican en el sitio a través del proceso de unión combinatoria de V(D)J. La mayoría de los linfocitos de sangre periférica en dichas especies son IgM+, IgD+, o linfocitos B naive con genes VDJ y VJ sin diversificar, aún en adultos. Así, debe haber menos presión  
25 para producir un compartimiento de linfocitos B rápidamente en animales con linfopoyesis B continua ya que los nuevos linfocitos B con nuevas especificidades antigénicas se producen de forma continua.

Por otro lado, en las especies con sistema GALT (tejido linfoide asociado a intestino) en las que la linfopoyesis B es breve, un grupo inicial de linfocitos B se forma en los inicios tempranos de la vida en los tejidos como el saco vitelino y el bazo, y posteriormente, los genes de inmunoglobulina (Ig) se diversifican en el sistema GALT. Ya que la detención de la linfopoyesis B es rápida, este compartimiento inicial de linfocitos B debe expandirse y diversificarse rápidamente para generar anticuerpos con especificidades biológicamente relevantes. Por ejemplo, la diversificación somática de los genes de Ig comienza incluso antes del nacimiento de los pollos, ovejas y vacas. Como consecuencia, casi todos los genes VDJ de los linfocitos de sangre periférica de los conejos adultos por ejemplo, están altamente diversificados y carecen de linfocitos B naive. Incluso, el conejo adulto es muy capaz de montar respuestas primarias de anticuerpos a antígenos previamente desconocidos. Esto es debido a que los linfocitos B que migran desde el GALT a la periferia parecen ser del repertorio de linfocitos B primarios, y aunque sus genes VDJ ya están diversificados, estos linfocitos B de vida larga y/o autorenovativos pueden mantener el repertorio de anticuerpos funcionales. También es probable que, como en el caso de los conejos, la estimulación antigénica exótica ayuda a dirigir la diversificación del repertorio de anticuerpos en especies con linfopoyesis B corta.

En los ratones normales, durante las respuestas inmunes primarias dependientes de linfocitos T, las mutaciones

somáticas de los genes de la región Ig V suceden en los linfocitos B del centro germinal, generando así variantes de linfocitos B que expresan inmunoglobulinas con afinidades alteradas para el antígeno. Las variantes con afinidad

5 mejorada se seleccionan positivamente a través de la inhibición de la apoptosis y al final, dicha alta afinidad de los linfocitos B forman la mayor parte de memoria específica de antígeno y poblaciones de linfocitos B formadoras de anticuerpos. Los linfocitos B con un receptor

10 de baja afinidad fracasan a la hora de recibir dichas señales de supervivencia dependientes de antígeno y experimentan apoptosis. Un aumento en los linfocitos B de alta afinidad, dentro de las poblaciones de linfocito B de memoria y formadores de anticuerpos, se refiere como

15 maduración de la afinidad.

En los ratones transgénicos con bcl-2, la sobreexpresión de bcl-2 resulta en la prevención de apoptosis no sólo de los linfocitos B de alta afinidad, sino también de los linfocitos B de baja afinidad. Los ratones

20 que sobreexpresan Bcl-2 poseen un número excesivo de linfocitos B de memoria que no están seleccionados por afinidad. Por el contrario, la selección rigurosa de células formadoras de anticuerpo de alta afinidad de la médula ósea en los ratones bcl-2 no se ve influenciada por el transgén

25 bcl-2 y su número permanece sin cambios en comparación con los controles.

Mientras que los efectos de la sobreexpresión de bcl-2 en la supervivencia y desarrollo de linfocito B en otros

animales que experimentan linfopoyesis B continua puede ser similar a la del ratón, su papel en el desarrollo de linfocitos B de memoria y/o formadores de anticuerpos de animales que experimentan linfopoyesis B a corto plazo no  
5 está claro.

Por lo tanto, la presente invención está dirigida a los métodos para sobreexpresar un inhibidor de la apoptosiss, particularmente en animales con linfopoyesis B a corto plazo como conejos, aves, pollos, ovejas, cabras, vacas, cerdos,  
10 caballos y burros y aumentar la supervivencia de linfocitos B en dichos animales transgénicos. Además, cuando estos animales expresan además un translocus de Ig, la expresión del translocus de Ig se ve aumentada o prolongada y ya que son animales grandes, su cantidad de anticuerpos suele ser  
15 mayor. Así, esta invención tiene como objetivo crear animales fundadores más grandes que producen mayores cantidades exógenas de inmunoglobulinas a través del aumento de la supervivencia de linfocitos B.

En un aspecto, la presente invención está dirigida a  
20 construcciones transgénicas útiles para aumentar la supervivencia de los linfocitos B. Los transgenes o construcciones transgénicas son fragmentos de DNA con secuencias que codifican para una, o varias, proteínas naturales o sintéticas que no se encuentran normalmente en  
25 el animal o células del animal. Los fragmentos de DNA pueden introducirse en el genoma del animal mediante una serie de técnicas que incluye la microinyección de pronúcleos, transfección, clonación por transferencia de núcleos,

transferencia génica mediada por esperma, transferencia génica mediada por testículos y similares.

En una realización, la construcción transgénica comprende la molécula de ácido nucleico que codifica el inhibidor de la apoptosis, el polipéptido bcl-2 de conejo. Por "molécula de ácido nucleico que codifica el inhibidor de la apoptosis" se entiende la secuencia de DNA nativa, así como cualquier codón optimizado de la secuencia de DNA que codifica para una secuencia de polipéptido idéntica a la secuencia de DNA nativa, pero que posee una secuencia de DNA diferente basada en la degeneración de codones. Este concepto se discute en detalle más adelante. En otra realización, la construcción transgénica comprende la molécula de ácido nucleico que codifica cualquier inhibidor de la apoptosis. El gen inhibidor de la apoptosis, como el gen bcl-2 de conejo o el gen bcl-2 humano, se expresa preferiblemente en los linfocitos B del animal transgénico mediante un promotor inmuno-específico, preferiblemente un promotor específico de linfocito B. Por lo tanto, se aumenta la expresión del inhibidor de la apoptosis preferiblemente en los linfocitos B solos, conduciendo a un aumento de la supervivencia de los linfocitos B en los animales transgénicos no humanos. Por "promotor específico de linfocito B" se entiende una secuencia promotora/potenciadora de cualquier gen específico de linfocito B, y/o variantes o porciones diseñadas de los mismos, que normalmente controlan la expresión de los genes expresados en un linfocito B, ejemplos de los cuales

incluyen, pero no se limitan a, promotores/potenciadores de CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD40, CD72, Blimp-1, CD79b (también conocidos como B29 o Ig beta), mb-1 (también conocido como Ig alfa), quinasa de tirosina blk, VpreB, 5 cadena pesada de inmunoglobulina, cadena ligera kappa de inmunoglobulina, cadena ligera lambda de inmunoglobulina, cadena J de inmunoglobulina, etc. En una realización preferible, el promotor/potenciador de la cadena ligera kappa dirige la expresión específica de linfocito B del gen 10 inhibidor de la apoptosis bcl-2 de conejo.

En aún otra realización, la construcción transgénica que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica el inhibidor de la apoptosis se coexpresa con una construcción transgénica que comprende una inmunoglobulina exógena o 15 locus transgénico de cadena de inmunoglobulina (Ig). En esta realización, ambos locus transgénicos de Ig y el transgén inhibidor de la apoptosis puede estar presente en el mismo vector de expresión transgénico o en dos vectores de expresión transgénicos diferentes. En este último caso, los 20 dos vectores de expresión transgénicos pueden introducirse en el animal transgénico no humano a la vez o de forma secuencial.

La presente invención también proporciona construcciones transgénicas que comprenden un transgén 25 quimérico que codifica una proteína de fusión que comprende un transgén que codifica una proteína de fusión que comprende secuencias de polipéptidos en el siguiente orden: a) una inmunoglobulina o cadena de inmunoglobulina; b) un

péptido autoescindible; c) un inhibidor de la apoptosis; y opcionalmente, d) un sitio de escisión de proteasas entre a) y b). Aquí, la expresión del inhibidor de la apoptosis está unido o acoplado a la expresión de la cadena ligera o pesada de la inmunoglobulina o utilizando los mecanismos discutidos más adelante. Esta construcción transgénica también se denomina construcción con el locus de Ig - diana de escisión de proteasa - péptido de autoescisión - inhibidor de la apoptosis. En esta construcción, se añade una diana de escisión de proteasas opcionalmente para facilitar la eliminación de la secuencia de péptido autoescindible F2A de la inmunoglobulina; por ejemplo, a partir del exón M2 de la Ig, para prevenir cualquier interferencia potencial de la secuencia de péptido F2A con señalización (y por lo tanto desarrollo de linfocito B). Los sitios de escisión de proteasa pueden reconocerse mediante cualquier proteasa expresada de forma constitutiva. Los sitios de escisión de proteasa útiles aquí incluye, pero no se limitan a, proteasas aspárticas, proteasas de cisteína, metaloproteasas, proteasas de serina proteasas de treonina, etc. En una realización preferible, el sitio de escisión de la proteasa es el sitio de escisión de furina.

Los transgenes quiméricos descritos anteriormente comprenden secuencias de DNA que codifican un péptido autoescindible (por ejemplo, péptido 2A o péptido tipo 2A). La inserción de la secuencia que codifica un péptido autoescindible entre la secuencia que codifica una inmunoglobulina y una secuencia de inhibidor de la apoptosis

en el transgén resulta en la producción de un mensajero de RNA. La traducción de este mRNA, no obstante, resulta en dos proteínas separadas, la(s) inmunoglobulina(s) y el inhibidor de la apoptosis, gracias al mecanismo autoescindible del péptido. Por lo tanto, la expresión del inhibidor de la apoptosis puede acoplarse a la reordenación funcional de los segmentos VDJ o VJ.

En una realización de la invención, la autoescisión está mediada por los péptidos 2A/2B, o las secuencias tipo 2A /2B de virus que incluye la familia de virus picornaviridae, la familia de virus de rinitis equina A (ERAV), la familia de virus de insectos tipo picornavirus y a la familia de virus de rotavirus de tipo C. La familia de virus de picornaviridae incluye los virus entero-, rino-, cardio- y afto- y de la fiebre aftosa (FMDV). La familia de virus de insecto de picornavirus incluye virus como el virus infeccioso flacherie (IFV), el virus de Drosophila C (DCV), el virus de la parálisis aguda de las abejas (ABPV) y el virus de la parálisis del grillo (CrPV) y el virus de insecto del asigna de Thosea (TaV). El tipo de familia de rotavirus C incluye los rotavirus bovino, porcino y humano de tipo C. En otras realizaciones, las secuencias escindibles pueden incluir secuencias tipo 2A/ 2B de poliovirus, rinovirus, virus coxsackie, virus de la encefalomiocarditis (EMCV), mengovirus, el teschovirus-1 porcino, o el virus de la encefalitis murina de Theiler (TMEV), etc. En una realización preferible, la secuencia de proteína autoescindible es el péptido 2A/2B del virus de la



fiebre aftosa (FMDV), el virus de la rinitis A equina (ERAV), o el virus del asigna de Thosa (TaV); Palmenberg et al., Virology 190:754-762 (1992); Ryan et al., J Gen Virol 72:2727-2732 (1991); Donnelly et al., J Gen Virol 82:1027-1041 (2001); Donnelly et al., J Gen Virol 82:1013-1025 (2001); Szymaczak et al., Nature Biotech 22(5):589-594 (2004). Así, al utilizar el péptido autoescindible, la expresión del gen inhibidor de la apoptosis está unido o acoplado a la expresión del translocus de Ig en los linfocitos B exógenos. La supervivencia selectiva de linfocitos B exógenos sobre los linfocitos B endógenos resulta en una producción reducida de inmunoglobulina endógena pero con el correspondiente aumento de la producción de polipéptido/proteína codificada en el translocus de Ig.

Mientras que se discute si bcl-2 es un prototipo de inhibidor de la apoptosis, otros inhibidores de la apoptosis también se incluyen para su uso en la construcción de transgenes quiméricos. Estos incluyen, sin limitarse, a mutantes dominantes negativos de caspasa-9 (caspasa-9DN), baculovirus p35, caspasa-9S, crmA, z-VAD-fmk, z-DEVD-fmk, B-D-fmk, y z-YVAD-fmk, otros miembros de la familia bcl-2 como Bcl-xL, Mcl-1, etc., inhibidores de moléculas proapoptóticas como Bax, Bak, Bad, inhibidores de "dominio BH3 sólo" moléculas como Bid, Bim, PUMA, Noxa, etc., otros inhibidores endógenos de la caspasa como IAP (inhibidor de proteínas de apoptosis) que incluye, pero no se limita a XIAP, TIAP, KIAP, NAIP, cIAP1, cIAP2, API1,

API2, API3, API4, HIAP1, HIAP2, MIHA, MIHB, MIHC, ILP, ILP-2, TLAP, survivina, livina, apollon, BRUCE, y MLIAP, etc., proteínas como SODD y FLIP, etc. involucradas en la regulación negativa de los receptores de muerte y variantes de los mismos. En una realización específica, el inhibidor del gen de la apoptosis puede ser un gen bcl-2 de mamífero y en realizaciones preferibles, el gen bcl-2 de mamífero se selecciona de entre el grupo que consiste en bcl-2 humano, bcl-2 de ratón y bcl-2 de conejo de Id. de Sec. N°: 5. En una realización preferible, se utiliza el gen bcl-2 de conejo de Id. de Sec. N°: 5. En aún otro aspecto de la invención, el transgén codifica cadenas pesadas de inmunoglobulina y/o cadenas ligeras de inmunoglobulina o partes de las mismas. El loci puede estar en la configuración de línea germinal o en una forma reordenada. Las secuencias codificantes o partes de las mismas pueden codificar inmunoglobulinas humanas resultantes de la expresión de anticuerpos humanos (humanizados).

Los transgene(s) que codifican anticuerpos humanos (humanizados) contiene(n) un locus de Ig o una gran porción de un locus de Ig, que contiene uno o varios segmentos de Ig humana (por ejemplo, un segmento génico de Ig V, D, J o C humana). Alternativamente, el transgén es un locus de inmunoglobulina humana o una gran porción del mismo. El transgén que contiene dicho locus de Ig humana o dicho locus de Ig modificado o porción modificada de un locus de Ig, también se refieren aquí como "un translocus de Ig humana (humanizada)", es capaz de experimentar una reordenación

génica en el transgénico animal no humano para producir un repertorio diversificado de anticuerpos que poseen al menos una porción de una secuencia de polipéptido de inmunoglobulina humana.

5 Los genes de la cadena ligera o pesada de la inmunoglobulina comprenden varios segmentos codificados por genes individuales y separados por secuencias de intrones. Estos genes para la cadena pesada de inmunoglobulina humana se encuentran en el cromosoma 14. La región variable de la  
10 cadena pesada (VH) comprende tres segmentos génicos: segmentos V; D y J, seguidos de múltiples genes que codifican la región C. La región V está separada de la región C por un espacio grande, y los genes individuales que codifican los segmentos V, D y J también están separados por  
15 espaciadores.

Existen dos tipos de cadenas ligeras de inmunoglobulina:  $\kappa$  y  $\gamma$ . Los genes de la cadena ligera  $\kappa$  humana se encuentran en el cromosoma 2 y los genes de la cadena ligera  $\gamma$  humana se encuentran en el cromosoma 22. La  
20 región variable de las cadenas ligeras del anticuerpo incluye un segmento V y un segmento J, codificada por segmentos génicos separados. En la configuración de línea germinal del gen de la cadena ligera  $\kappa$ , existen aproximadamente 100-200 genes de la región V en reordenación  
25 lineal, cada gen con su propia secuencia líder, seguida de aproximadamente 5 segmentos génicos J, y un segmento génico C de región . Todas las regiones V están separadas por intrones, y existen a su vez intrones separando las

segmentos génicos de las regiones V, J y C.

Adicionalmente, los vectores que contienen las construcciones transgénicas descritas anteriormente pueden contener además secuencias de DNA que codifican marcadores  
5 de selección de antibióticos como gentamicina, neomicina o kanamicina etc. y/o otros componentes convencionales de la expresión de vectores.

La presente invención proporciona métodos para aumentar la expresión de inmunoglobulinas en un animal transgénico no  
10 humano que experimentan linfopoyesis a corto plazo que comprende la introducción en el animal transgénico que experimenta linfopoyesis a corto plazo, al menos una construcción transgénica que comprende un transgén de inhibidor de la apoptosis dirigido por un  
15 promotor/potenciador específico de linfocito B. Así, la apoptosis de dichos linfocitos B con la construcción transgénica se ve inhibida y la producción de inmunoglobulinas o cadena de inmunoglobulina está aumentada. En otra realización de este método, el animal transgénico no  
20 humano que experimenta linfopoyesis a corto plazo puede comprender además una(s) inmunoglobulina(s) exógena(s) o locus transgénico de cadena de inmunoglobulina. Esto resulta en una mayor proporción de inmunoglobulina exógena que puede simplificar enormemente la purificación y producción de  
25 anticuerpos. En este ejemplo, el inhibidor del gen de la apoptosis puede introducirse, como parte de una construcción de expresión transgénica que también introduce el translocus de Ig, o en diferentes construcciones transgénicas.

La invención también proporciona otro método para aumentar de forma selectiva la expresión de una(s) inmunoglobulina(s) exógena(s)/cadena de inmunoglobulina en un linfocito B exógeno de un animal transgénico no humano, en el que se acopla la expresión de la(s) inmunoglobulina(s) exógena(s)/cadena de inmunoglobulina y un transgén con un inhibidor de la apoptosis en el linfocito B exógeno. Por lo tanto, no hay expresión del inhibidor de la apoptosis en linfocitos B endógenos, o linfocitos B que no expresan el translocus de Ig. Debido a la reordenación productiva del translocus de la inmunoglobulina exógena y el aumento en la supervivencia de linfocitos B exógenos, la producción de inmunoglobulinas codificadas por el transgén está aumentada sobre la producción de inmunoglobulina endógena. Así, la supervivencia de linfocitos B exógeno está aumentada y la producción de inmunoglobulina(s) exógena(s)/cadena de inmunoglobulina también está aumentada.

La presente invención proporciona además secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas, polipéptidos o secuencias de péptido de bcl-2 de conejo, que es un inhibidor de la apoptosis. También se contempla que una secuencia dada de ácido nucleico para el bcl-2 de conejo pueda estar representada por variantes naturales que poseen secuencias ligeramente diferentes de ácido nucleico pero, que sin embargo, codifican la misma proteína. Además, el término codón funcionalmente equivalente se utiliza en este documento para referirse a los codones que codifican el mismo aminoácido, por ejemplo, los seis codones para la

arginina o serina, y también se refiere a los codones que codifican aminoácidos biológicamente equivalentes, como se discute en el presente documento.

Los segmentos de DNA de bcl-2 de conejo utilizados en la presente invención abarcan polipéptidos y péptidos modificados biológicamente y funcionalmente equivalentes. Dichas secuencias pueden surgir como consecuencia de la redundancia de codones y a la equivalencia funcional que se sabe que ocurre de forma natural en las secuencias de ácidos nucleico y de las proteínas codificadas. Alternativamente, las proteínas o péptidos funcionalmente equivalentes pueden crearse mediante la aplicación de tecnología de DNA recombinante, en que los cambios en la estructura de proteínas pueden diseñarse, en base a las consideraciones de las propiedades de los aminoácidos a cambiar. Los cambios diseñados pueden introducirse a través de la aplicación de técnicas de mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo, para introducir mejoras en la antigenicidad de la proteína, para reducir los efectos de la toxicidad de la proteína in vivo a un sujeto que se le administra la proteína, o para aumentar la eficacia de cualquier tratamiento que involucra a la proteína.

Permitiendo la degeneración del código genético, la invención incluye secuencias que poseen al menos alrededor del 50%, normalmente al menos alrededor del 60%, más habitualmente alrededor del 70%, aún más frecuentemente alrededor del 80%, preferiblemente al menos alrededor del 90% y más preferiblemente alrededor del 95% de identidad de

secuencia con la secuencia de nucleótidos del gen bcl-2 de conejo o el gen bcl2 humano, respectivamente. Estas también se denominan secuencias con codones optimizados y se discuten a continuación en los llamados codones equivalentes  
5 funcionalmente.

El término equivalente biológicamente funcional es bien conocido en la materia y se define en más detalle aquí. De acuerdo con esto, las secuencias que poseen entre alrededor del 70% y alrededor del 80%; o más preferiblemente, entre  
10 alrededor del 81% y alrededor del 90%; o incluso más preferiblemente, entre alrededor del 91% y alrededor del 99% de identidad a nivel de aminoácidos se consideran equivalentes funcionalmente al polipéptido bcl-2 de conejo, siempre que la actividad biológica de la proteína se  
15 mantenga.

El término codón equivalente funcionalmente se utiliza aquí para referirse a los codones que codifican el mismo aminoácido, como los seis codones de la arginina o la serina, y también se refiere a los codones que codifican  
20 aminoácidos equivalentes biológicamente.

La siguiente discusión se basa en el cambio de los aminoácidos de una proteína para crear un equivalente, o incluso una molécula mejorada, de segunda generación. Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros  
25 aminoácidos en una estructura proteica sin una pérdida apreciable de la capacidad de unión interactiva con las estructuras como, por ejemplo, regiones de unión a antígeno de los anticuerpos o puntos de unión en las moléculas

sustrato. Como es la capacidad de interacción y la naturaleza de una proteína lo que define la actividad funcional biológica de una proteína, pueden realizarse ciertas sustituciones de aminoácidos en una secuencia de proteína, y en la secuencia de DNA subyacente que la codifica, y sin embargo obtener una proteína con propiedades similares. Por lo tanto, los inventores contemplan que pueden realizarse varios cambios en las secuencias de DNA de los genes sin una pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica, como se discute a continuación.

Al realizar dichos cambios, también puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos en la aportación de función biológica interactiva a una proteína es conocida generalmente en la materia (Kyte y Doolittle, 1982). Está aceptado que el carácter relativo hidropático de un aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, DNA, anticuerpos, antígenos y similares.

También es conocido en la materia que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse de forma efectiva en base a su hidrofiliidad. La patente estadounidense N° 4.554.101 muestra que la mayor hidrofiliidad promedia local de una proteína, que viene dada por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, correlaciona con una propiedad biológica de la proteína. Como se detalla en la patente



estadounidense N° 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofiliicidad a los residuos aminoacídicos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspártico (+3,0.+-,1); glutámico (+3,0.+-,1); serina (+0,3); asparagina (+0,2)  
5 glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5.+-,1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4).

10 Se entiende que puede sustituirse un aminoácido por otro con un valor de hidrofiliicidad similar y seguir obteniendo una proteína equivalente biológicamente y equivalente inmunológicamente. En tales cambios, es preferible la substitución de aminoácidos cuyos valores de  
15 hidrofiliicidad están entre .+-,2, son particularmente preferibles los de los que están entre .+-,1, y son incluso más particularmente preferibles los de los que están entre .+-,0,5.

Como se remarca aquí, las substituciones de aminoácidos  
20 generalmente se basan en la similitud relativa de los substituyentes de las cadenas laterales de los aminoácidos, por ejemplo, de su hidrofobicidad, hidrofiliicidad, carga, tamaño y similares. Los ejemplos de substituciones que toman en consideración las anteriores distintas características  
25 son bien conocidas para los expertos en la materia e incluyen: arginina y lisina; glutámico y aspártico; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

Otra realización para la preparación de polipéptidos de acuerdo con la invención es la utilización de miméticos de péptidos. Los miméticos son moléculas que contienen péptidos que mimetizan elementos de la estructura secundaria de la proteína (Johnson 1993). La razón subyacente para la utilización de miméticos de péptidos es que el esqueleto peptídico de las proteínas existe principalmente para orientar las cadenas laterales de los aminoácidos de tal manera que se faciliten las interacciones moleculares, como las de un anticuerpo y un antígeno. Es esperable que un mimético de péptidos permita interacciones moleculares similares a las de la molécula natural. Estos principios pueden utilizarse, junto con los principios mencionados anteriormente, para diseñar moléculas de segunda generación con muchas de las propiedades naturales de los inhibidores de la apoptosis con características alteradas y mejoradas.

Por lo tanto, la secuencias de ácido nucleico variantes que codifican el bcl-2 de conejo y polipéptidos funcionalmente equivalentes del bcl-2 de conejo son útiles como inhibidores de la apoptosis en esta invención.

La capacidad del sistema inmune de proteger frente a las infecciones se basa en una maquinaria genética especializada para crear un repertorio diverso de anticuerpos. Los genes que codifican los anticuerpos en los linfocitos B se ensamblan de manera que permiten combinaciones innumerables de puntos de unión en la región variable (V). Se estima que de tales mecanismos pueden obtenerse más de  $10^{12}$  posible estructuras de unión. En todos

los animales, lo que incluye los humanos, el proceso de generación de anticuerpos se inicia recomblando segmentos variables (V), de diversidad (D) y de unión (J) del locus de las inmunoglobulinas (Ig). Tras este paso, dependiendo de la especie del animal, se utilizan dos mecanismos generales para producir las diversas estructuras de unión de los anticuerpos.

En algunos animales, como el humano y el ratón, existen múltiples copias de los segmentos génicos V, D y J en el locus de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, y múltiples copias de los segmentos génicos V y J en el locus de la cadena ligera de las inmunoglobulinas. La diversidad de los anticuerpos en estos animales se genera primordialmente mediante reordenamiento génico, es decir, diferentes combinaciones de segmentos génicos para formar una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera reordenadas. En otros animales (por ejemplo, conejos, aves, por ejemplo, pollo, ganso y pato, ovejas, cabras y vacas), sin embargo, reordenamiento génico tiene un papel poco importante en la generación de la diversidad de los anticuerpos. Por ejemplo, en los conejos, sólo un número muy limitado de segmentos génicos V, más a menudo los segmentos génicos V del extremo 3' de la región V, se utilizan en el reordenamiento génico para formar un segmento VDJ contiguo. En los pollos, sólo se utilizan un segmento génico V (el que está adyacente a la región D o "segmento génico V proximal en 3'"), un segmento D y un segmento J en el reordenamiento de la cadena pesada; y sólo

se utilizan un segmento génico V (el segmento V proximal en 3') y un segmento J en el reordenamiento de la cadena ligera. Por lo tanto, en estos animales, existe poca diversidad entre las secuencias de la región variable reordenadas inicialmente y resultantes de la diversificación de la uniones. Se consigue una diversificación adicional de los genes de las Ig reordenados mediante conversión génica, un proceso en el que secuencias cortas derivadas de los segmentos génicos V anteriores reemplazan a secuencias cortas del segmento génico V en el gen de la Ig reordenado. Puede generarse diversificación adicional de las secuencias de anticuerpo mediante hipermutación.

Las inmunoglobulinas (anticuerpos) se clasifican en cinco clases (IgG, IgM, IgA, IgE, y IgD, cada una de las cuales posee diferentes papeles biológicos en la defensa inmune. La más abundante en la sangre y más potente en la respuesta a la infección es la clase IgG. En la clase IgG humana, hay cuatro subclases (isotipos IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4) determinadas por la estructura de las regiones constantes de la cadena pesada que comprenden el dominio Fc. Los dominios F(ab) de los anticuerpos se unen a secuencias específicas (epítomos) en los antígenos, mientras el dominio Fc de los anticuerpos recluta y activa otros componentes del sistema inmune para eliminar los antígenos.

Los anticuerpos e inmunoglobulinas nativos habitualmente son glucoproteínas heterotetraméricas de alrededor de 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas.

Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante enlace(s) disulfuro covalentes, y el número de enlaces disulfuro varia entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera  
5 también posee enlaces disulfuro intracadena regularmente espaciados. Cada cadena pesada posee en un extremo un dominio variable (VH) seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera posee un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en el otro extremo;  
10 el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos aminoacídicos particulares forman una interfaz entre los  
15 dominios variables de la cadena ligera y pesada (Chothia et al., J. Mol. Biol. 186:651 (1985); Novotny y Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:4592 (1985)).

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren  
20 extensivamente en la secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuido de forma homogénea a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Se  
25 concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables, ambas en los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada. Las porciones altamente

conservadas de los dominios variables se denominan marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno de ellos cuatro regiones FR, conectadas por tres CDR. Las CDR de cada cadena se  
5 mantienen unidas en gran proximidad mediante las regiones FR y, junto con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del punto de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>a</sup> Edición, National Institute of Health,  
10 Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están involucrados en la unión del anticuerpo a un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

15 La creación de translocus humano - animal permite la creación de animales transgénicos que expresan anticuerpos (policlonales) humanos (humanizados) de gran afinidad y diversificados, con un elevado rendimiento. En general, la humanización de un locus de inmunoglobulina (Ig) en un  
20 animal no humano involucra la integración de uno o más segmentos génicos de la Ig humana en el genoma del animal para crear el loci de inmunoglobulina humana (humanizada). Por lo tanto, la creación de un locus de la cadena pesada de la Ig humana (humanizada) involucra la integración de uno o  
25 más segmentos V y/o D y/o J, y/o segmentos de la región C en el genoma del animal. De forma similar, la creación de un locus de la cadena ligera de la Ig humanizada involucra la integración de uno o más segmentos V y/o J, y/o segmentos de

la región C en el genoma del animal.

Independientemente de la localización cromosómica, el locus de la Ig humana (humanizada) de la presente invención puede someterse a un reordenamiento génico, conversión  
5 génica e hipermutación en el animal no humano, produciendo de este modo un repertorio diversificado de moléculas de Ig humana (humanizada). Un locus de Ig que puede someterse a reordenamiento génico y conversión génica también se denomina un locus de Ig "funcional" y los anticuerpos con  
10 una diversidad generados mediante un locus de Ig funcional también se denominan anticuerpos "funcionales" o un repertorio "funcional" de moléculas de anticuerpo.

En un aspecto, los animales en los que la diversificación del repertorio de anticuerpos se detiene de  
15 forma temprana en la vida son útiles en la presente invención. Los linfocitos B se desarrollan a partir de células madre hematopoyéticas. Previamente a la exposición al antígeno, los linfocitos B sufren una serie de pasos de maduración, cuyo producto final es una célula B madura, que  
20 expresa una IgM asociada a membrana única y a menudo IgD sobre su superficie celular junto con otras moléculas de señalización de la superficie celular. Mientras en humanos, la diversificación de los anticuerpos mediante reordenamiento génico ocurre a lo largo de la vida, en otros  
25 animales la diversificación del repertorio de anticuerpos se detiene de forma temprana en la vida, normalmente durante el primer mes de vida.

En un aspecto de esta invención, los animales a los que

pueden administrarse las construcciones de DNA de la invención incluyen, pero no se limitan a, mamíferos (por ejemplo humanos, primates no humanos, roedores (por ejemplo ratones y ratas), no roedores (por ejemplo conejos, cerdos, 5 ovejas, cabras, vacas, cerdos, caballos y burros), y aves (por ejemplo, pollos, pavos, patos, gansos y similares). Los animales a los que pueden administrarse las construcciones de DNA de la invención incluyen los "animales con conversión génica", es decir, animales que crean la diversidad de anticuerpos sustancialmente mediante conversión génica y/o 10 hipermutación somática (por ejemplo conejos, aves, vacas, cerdos, etc.), y animales en los que el reordenamiento de los anticuerpos se detiene de forma temprana en la vida, es decir, normalmente durante el primer mes de vida (por ejemplo conejos, aves, ovejas, cabras, vacas, cerdos, 15 caballos, etc.).

Además, los animales a los que pueden administrarse las construcciones de DNA de la invención también incluyen a cualquiera de los animales no humanos descritos 20 anteriormente, que además son portadores de un transgén que codifica un translocus exógeno de inmunoglobulina, preferiblemente, una secuencia de la cadena pesada de las inmunoglobulinas o la cadena ligera de las inmunoglobulinas humana o humanizada, o partes de la misma. El locus del 25 transgén puede estar en la configuración de línea germinal o en forma reordenada. Como los transgenes codifican inmunoglobulinas humanas o humanizadas o partes de las mismas, resultan en la generación de anticuerpos



humanizados. Por lo tanto, por ejemplo, utilizando los métodos descritos anteriormente, puede obtenerse una producción mejorada de anticuerpos humanizados en animales no humanos diana utilizando el inhibidor de la apoptosis  
5 bcl-2 de conejo descrito en esta invención.

De acuerdo con la presente invención, se obtiene un animal transgénico capaz de producir inmunoglobulinas humanas (humanizadas) al introducir en una célula o células receptoras de un animal, uno o más de los vectores  
10 transgénicos descritos aquí anteriormente, uno de los cuales es portador de un locus de una Ig humana (humanizada), y que deriva de un animal a partir de una célula o células receptoras modificadas genéticamente.

La células receptoras pueden proceder, por ejemplo, de  
15 animales no humanos que generan de diversidad de anticuerpos mediante conversión génica y/o hipermutación, por ejemplo, aves (como el pollo), conejos, vacas y similares. En tales animales, el segmento génico V en 3' proximal se utiliza de forma preferente para la producción de inmunoglobulinas. La  
20 integración de un segmento génico V humano en el locus de las Ig en el vector transgénico, mediante el reemplazo del segmento génico V en 3' proximal del animal o mediante la localización en gran cercanía al segmento génico V en 3' proximal, resulta en la expresión de secuencias  
25 polipeptídicas de la región V humana en la mayoría de inmunoglobulinas. Alternativamente, un segmento V(D)J human reordenado puede insertarse en el locus J del locus de las inmunoglobulinas del vector transgénico.

Los vectores transgénicos que contienen los genes de interés, es decir, el locus de la Ig humana (humanizada) y el gen del inhibidor de la apoptosis pueden introducirse en la célula o células recipientes y luego integrarse en el  
5 genoma de la célula o células receptoras mediante una integración al azar o mediante una integración localizada.

Para la integración al azar, un vector transgénico que contiene un locus de Ig humana (humanizada) puede introducirse en una célula receptora animal mediante la  
10 tecnología de obtención de transgénicos estándar. Por ejemplo, un vector transgénico puede inyectarse directamente en el pronúcleo de un oocito fertilizado. Un vector transgénico también puede introducirse mediante la coincubación de espermatozoides con el vector transgénico antes de  
15 la fertilización del oocito. Los animales transgénicos pueden desarrollarse a partir de oocitos fertilizados. Otra forma de introducir un vector transgénico es transfectando células madre embrionarias y subsiguientemente inyectar las células madre embrionarias genéticamente modificadas en los  
20 embriones en desarrollo. Alternativamente, un vector transgénico (sólo o en combinación con reactivos de facilitado) puede inyectarse directamente en un embrión en desarrollo. En último término, los animales transgénicos quiméricos se producen a partir de los embriones que  
25 contienen el transgén de la Ig humana (humanizada) integrado en el genoma de al menos algunas células somáticas del animal transgénico.

En una realización particular, un transgén que contiene

un locus de una Ig humana (humanizada) se integra al azar en el genoma de células receptoras (como un oocito fertilizado o embriones en desarrollo) derivadas de variantes del animal con una expresión alterada de los genes de las

5 inmunoglobulinas endógenas. La utilización de tales variantes del animal permite la expresión preferencial de las moléculas de inmunoglobulina del locus de la Ig transgénica humana (humanizada). Ejemplos de tales animales incluyen las variantes de conejo Alicia y Basilea, así como

10 la variante de pollo agammaglobulinémico, y como los ratones *knock-out* para las inmunoglobulinas. Alternativamente, los animales transgénicos con transgenes o loci de inmunoglobulinas humanas (humanizadas) pueden cruzarse con variantes de animales con expresión alterada de las

15 inmunoglobulinas endógenas. Puede obtenerse descendencia homocigota de un locus de Ig endógena alterado y un locus de Ig transgénica humana (humanizada).

Para la integración localizada, un vector transgénico puede introducirse en las células receptoras animales

20 apropiadas como células madre embrionarias o como células somáticas ya diferenciadas. Después, las células en las que el transgén se ha integrado en el genoma del animal y ha reemplazado al locus de la Ig endógena correspondiente mediante recombinación homóloga, pueden seleccionarse

25 mediante los métodos estándar (véase por ejemplo, Kuroiwa et al, Nature Genetics 2004, 6 Junio). Entonces las células seleccionadas pueden fusionarse con células unidades de transferencia nuclear anucleadas, por ejemplo oocitos o

células madre embrionarias, células que son totipotentes y que pueden formar un neonato funcional. La fusión se realiza de acuerdo con técnicas convencionales que están bien establecidas. La anucleación de oocitos y la transferencia nuclear también puede realizarse mediante microcirugía utilizando pipetas de inyección (véase, por ejemplo, Wakayama et al., Nature (1998) 394:369). Las células embrión resultantes se cultivan a continuación en un medio apropiado, y se transfieren a recipientes sincronizados para generar los animales transgénicos. Alternativamente, las células modificadas genéticamente seleccionadas pueden inyectarse en embriones en desarrollo que se desarrollan subsiguientemente en animales quiméricos.

Además, de acuerdo con la presente invención, también puede obtenerse un animal transgénico capaz de producir inmunoglobulinas humanas (humanizadas) mediante la introducción en una célula o células recipiente, de uno o más de los vectores de recombinación descritos aquí anteriormente, uno de los cuales es portador de un segmento génico de la Ig humana, ligado a las secuencias flanqueantes 5' y 3' que son homólogas a las secuencias flanqueantes del segmento génico de la Ig endógena, luego seleccionando células en las que el segmento génico de la Ig endógena se ha reemplazado por el segmento génico de la Ig humana mediante recombinación homóloga, y derivando un animal a partir de la célula o células receptoras modificadas genéticamente seleccionadas.

De forma similar a la inserción de la diana de un

vector transgénico, las células apropiadas para su utilización como células receptoras en esta aproximación incluyen las células madre embrionarias o las células somáticas ya diferenciadas. Un vector de recombinación que  
5 es portador de un segmento génico de una Ig humana puede introducirse en tales células receptoras mediante cualquier método posible, por ejemplo, la transfección. A continuación, las células en las que se ha reemplazado con el segmento génico de una Ig humana el correspondiente  
10 segmento génico de una Ig endógena mediante recombinación homóloga, pueden seleccionarse mediante métodos estándar. Estas células modificadas genéticamente pueden servir como células donantes de núcleos en un procedimiento de transferencia nuclear para la clonación de un animal  
15 transgénico. Alternativamente, las células madre embrionarias modificadas genéticamente seleccionadas pueden inyectarse en embriones en desarrollo que subsiguientemente pueden desarrollarse en animales quiméricos.

En una realización específica, las construcciones  
20 transgénicas de la invención pueden introducirse en los animales transgénicos durante la vida embrionaria mediante la inyección directa de los transgenes en el embrión o indirectamente mediante su inyección en la madre gestante o en la gallina ponedora de huevos. Como consecuencia, debido  
25 a la inhibición de la apoptosis en las células B exógenas, la descendencia transgénica habrá aumentado la producción de anticuerpos humanos (humanizados) en respuesta a la inmunización con antígenos.

Los animales transgénicos obtenidos mediante cualquiera de los métodos anteriores forman otra realización de la presente invención. Los animales transgénicos poseen al menos uno, es decir uno o más, loci de Ig humana  
5 (humanizada) en el genoma, a partir del cual se produce un repertorio funcional de anticuerpos humanos (humanizados).

En una realización específica, la presente invención proporciona conejos transgénicos que expresan uno o más loci de Ig humana (humanizada) y un gen inhibidor de la  
10 apoptosis. En los conejos transgénicos de la presente invención se pueden dar el reordenamiento y conversión génica de los loci de Ig humana (humanizada), y expresan un repertorio funcional de anticuerpos humanos (humanizados).

En otra realización específica, la presente invención  
15 proporciona pollos transgénicos que expresan uno o más loci de Ig humana (humanizada) y un gen inhibidor de la apoptosis. En los pollos transgénico de la presente invención se pueden dar el reordenamiento y conversión génica de los loci de Ig humana (humanizada), y expresan un  
20 repertorio funcional de anticuerpos humanos (humanizados).

En otra realización específica, la presente invención proporciona ratones transgénicos que expresan una o más regiones V humanas (humanizadas) y el gen inhibidor de la apoptosis bcl-2 de conejo. La región V humana (humanizada)  
25 comprende al menos dos segmentos génicos V humanos flanqueados por secuencias espaciadoras no humanas. En los ratones transgénicos se pueden dar el reordenamiento de los elementos V humanos y expresan un repertorio funcional de

anticuerpos.

La inmunización con antígeno da lugar a la producción de anticuerpos humanos (humanizados) frente a este antígeno en dichos animales transgénicos.

5 Aunque las realizaciones preferibles de la presente invención se dirigen a animales transgénicos con loci de Ig humana (humanizada), debe entenderse que los animales transgénicos con loci de Ig primatizada y antisueros policlonales primatizados también se encuentran dentro del  
10 alcance de la presente invención. De forma similar a las composiciones de antisueros policlonales humanos (humanizados), es probable que las composiciones de antisueros policlonales primatizados posean una inmunogenicidad reducida en individuos humanos.

15 Una vez obtenido un animal transgénico no humano que puede producir moléculas de inmunoglobulina humana (humanizada) diversificadas (como se establece más en detalle a continuación), las inmunoglobulinas humanas (humanizadas) y las preparaciones de anticuerpos humanos  
20 (humanizados) frente a un antígeno pueden obtenerse fácilmente inmunizando al animal con el antígeno. Pueden utilizarse una gran variedad de antígenos para inmunizar un animal huésped transgénico. Tales antígenos incluyen microorganismos, por ejemplo virus y organismos unicelulares  
25 (como las bacterias y los hongos), ya sea vivos, atenuados o muertos, fragmentos de microorganismos o moléculas antigénicas aisladas a partir de microorganismos.

Los antígenos bacterianos preferibles para su

utilización en la inmunización de un animal incluyen los antígenos purificados de *Staphylococcus aureus*, como los polisacáridos capsulares tipo 5 y 8, versiones recombinantes de los factores de virulencia como la alfa toxina, proteínas de unión a la adhesina, proteínas de unión al colágeno y proteínas de unión a la fibronectina. Los antígenos bacterianos preferibles también incluyen una versión atenuada de *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *enterococcus*, *enterobacter* y *Klebsiella pneumoniae*, o un sobrenadante de cultivo de estas células bacterianas. Otros antígenos bacterianos que pueden utilizarse en una inmunización incluyen el lipopolisacárido (LPS) purificado, antígenos capsulares, polisacáridos capsulares y/o versiones recombinantes de proteínas de la membrana externa, proteínas de unión a la fibronectina, endotoxina y exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*, *enterococcus*, *enterobacter* y *Klebsiella pneumoniae*.

Los antígenos preferibles para la generación de anticuerpos frente a los hongos incluyen una versión atenuada del hongo o proteínas de la membrana externa del mismo, y estos hongos incluyen, pero no se limitan a *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Cryptococcus neoformans*.

Los antígenos preferibles para su utilización en una inmunización para generar anticuerpos frente a virus incluyen las proteínas de la cubierta y versiones atenuadas de los virus, lo que incluye pero no se limita al virus respiratorio sincitial (RSV) (particularmente la Proteína



F), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la hepatitis B (HBV), citomegalovirus (CMV), EBV y HSV.

Pueden generarse anticuerpos terapéuticos para el tratamiento del cáncer inmunizando los animales transgénicos con células tumorales aisladas o líneas de células tumorales; los antígenos asociados a tumores incluyen, pero no se limitan al antígeno Her-2-neu (anticuerpos frente al cual son útiles para el tratamiento del cáncer de mama), los antígenos CD19, CD20, CD22 y CD53 (anticuerpos frente a los cuales son útiles para el tratamiento de linfomas de células B), los antígenos de membrana específicos de próstata (PMSA) (anticuerpos frente a los cuales son útiles para el tratamiento del cáncer de próstata) y la molécula 17-1A (anticuerpos frente a la cual son útiles para el tratamiento del cáncer de colon).

Los antígenos pueden administrarse a un animal huésped transgénico de cualquier modo conveniente, con o sin un adyuvante, y pueden administrarse de acuerdo con un esquema predeterminado.

Tras la inmunización, puede fraccionarse el suero o la leche de los animales transgénicos inmunizados para la purificación de anticuerpos policlonales de grado farmacéutico específicos del antígeno. En el caso de las aves transgénicas, los anticuerpos también pueden obtenerse fraccionando las yemas de los huevos. Puede obtenerse una fracción de inmunoglobulinas purificadas concentradas mediante cromatografía (de afinidad, de intercambio iónico, de filtración en gel, etc.), precipitación selectiva con

sales como el sulfato amónico, solventes orgánicos como el metanol o polímeros como el polietilenglicol.

Los anticuerpos fraccionados humanos (humanizados) pueden disolverse o diluirse en medios no tóxicos, no  
5 pirogénicos adecuados para la administración intravenosa en humanos, por ejemplo la salina tamponada estéril.

Las preparaciones de anticuerpo utilizadas para la administración se caracterizan generalmente por contener concentraciones de inmunoglobulina de entre 0,1 y 100 mg/ml,  
10 más habitualmente entre 1 y 10 mg/ml. La preparación de anticuerpo puede contener inmunoglobulinas de varios isotipos. Alternativamente, la preparación de anticuerpo puede contener anticuerpos de sólo un isotipo, o un número de isotipos seleccionados.

15 Para obtener un anticuerpo monoclonal humano (humanizado) se aíslan células del bazo del animal transgénico inmunizado, cuyos linfocitos B que expresan inmunoglobulinas endógenas del animal se han eliminado. Las células del bazo aisladas se utilizan en una fusión celular  
20 con una línea celular transformada para la producción de un hibridoma, o bien se clonan los cDNA que codifican los anticuerpos mediante técnicas estándar de biología molecular y se expresan en células transfectadas. Los procedimientos para obtener anticuerpos monoclonales están bien  
25 establecidos en la materia. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente europea 0 583 980 A1 ("Método para la generación de anticuerpos monoclonales a partir de conejos"), la patente estadounidense N° 4.977.081 ("Hibridomas conejo -

ratón estables y los productos de secreción de los mismos"), la WO 97/16537 ("Línea de linfocitos B de pollo estable y método para la utilización de la misma"), y PE 0 491 057 B1 ("Hibridoma que produce una inmunoglobulina G específica  
5 aviar"). La producción *in vitro* de anticuerpos monoclonales a partir de moléculas de cDNA clonadas se ha descrito en Andris-Widhopf et al., "Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display ", J Immunol Methods 242:159 (2000), y en Burton, D. R., "Phage  
10 display", Immunotechnology 1:87 (1995).

En la mayoría de ejemplos la preparación de anticuerpos consiste en inmunoglobulinas no modificadas, es decir , anticuerpos humanos (humanizados) preparados a partir del animal sin modificaciones adicionales, por ejemplo, mediante  
15 agentes químicos o enzimas. Alternativamente, la fracción de inmunoglobulinas puede someterse a un tratamiento como una digestión enzimática (por ejemplo con pepsina, papaína, plasmina, glucosidasas, nucleasas, etc.), calentamiento, etc. y/o un posterior fraccionamiento.

20 Las realizaciones de la invención están dirigidas a los transgenes que comprenden el inhibidor de la apoptosis bcl-2 de conejo que se expresa específicamente en los linfocitos B utilizando un promotor específico de linfocitos B. Otra realización está dirigida a los transgenes que comprenden el  
25 transgén con el locus de la Ig - péptido autoescindible - inhibidor de la apoptosis, en la que la expresión del gen inhibidor de la apoptosis está acoplada a la expresión del locus de la Ig. En esta realización pueden utilizarse varios

genes inhibidores de la apoptosis descritos anteriormente y aquellos conocidos en la materia, lo que incluye el inhibidor de la apoptosis bcl-2 de conejo.

Otras realizaciones de la invención están dirigidas a  
5 los métodos para potenciar la supervivencia de los linfocitos B utilizando las construcciones transgénicas descritas anteriormente. Cuando se utiliza la construcción transgénica de bcl-2 de conejo, el transgén puede introducirse en un animal transgénico que además comprende  
10 un transgén que codifica un locus de inmunoglobulinas potenciando así específicamente la supervivencia de las células B. Cuando se utiliza el transgén con el locus Ig - péptido autoescindible - inhibidor de la apoptosis, los linfocitos B exógenos sobreviven de forma selectiva y  
15 originan de forma productiva el gen codificado por el transgén. La selectividad se consigue acoplando la expresión de inmunoglobulina exógena con la expresión del inhibidor de la apoptosis. En las células B endógenas, el inhibidor de la apoptosis no se expresa y por lo tanto, la apoptosis no se  
20 inhibe. Tal expresión selectiva resulta en la producción preferente de la inmunoglobulina expresada por el transgén deseado sobre la inmunoglobulina producida endógenamente por el animal transgénico. Puede utilizarse cualquier variación de inhibidores de la apoptosis, péptidos autoescindibles o  
25 genes de las inmunoglobulinas descritas aquí o bien conocidas en la materia en esta construcción transgénica. En una realización preferible, el locus de la Ig del transgén es un translocus de inmunoglobulina humana (humanizada)/

cadena de inmunoglobulina.

La invención también proporciona un nuevo inhibidor de la apoptosis, el bcl-2 de conejo, que es útil para potenciar la supervivencia de las células.

5        En un aspecto de esta invención, el animal transgénico no humano que expresa el inhibidor de la apoptosis bcl-2 de conejo es preferiblemente un animal sometido a un desarrollo linfopoyético de linfocitos B a corto plazo discutido anteriormente, lo que incluye, pero no se limita a animales  
10 como conejos, pollos, ovejas y vacas, etc. Como estos animales son de mayor tamaño, su producción de anticuerpos y rendimiento, utilizando los métodos descritos anteriormente, también son mayores. En otro aspecto de la invención, el animal transgénico no humano que expresa el locus de la Ig -  
15 péptido autoescindible - inhibidor de la apoptosis, es cualquier animal, lo que incluye roedores (por ejemplo ratones, ratas), conejos, aves (por ejemplo pollos, pavos, patos, gansos, etc.), vacas, cerdos, ovejas, cabras, caballos, burros y otros animales de granja. En otro  
20 aspecto, los animales transgénicos utilizados en los métodos de la invención pueden ser animales con conversión génica o animales que puede realizar una diversificación de los anticuerpos por reordenamiento génico que se detiene de forma temprana en la vida. En una realización preferible, el  
25 animal transgénico no humano es el conejo.

Por lo tanto, las construcciones transgénicas, los vectores que comprenden las construcciones transgénicas y los animales transgénicos generados utilizando los métodos

descritos anteriormente son todos ellos realizaciones de la invención.

La invención está ilustrada adicionalmente, pero en ningún caso limitada, por los siguientes ejemplos.

5        **Ejemplo 1**

**Construcción de un vector de expresión inhibidor de la apoptosis con bcl-2 humano**

          El cribado de bibliotecas de BAC genómicos de conejo resultó en la identificación de dos BAC (179L1 y 19602; N°  
10 de registro de GeneBank: AY495827 y AY495828, respectivamente) que contienen los segmentos génicos K1 de la cadena ligera de conejo.

          Para la construcción de un vector de expresión inhibidor de la apoptosis específico de linfocitos B, se  
15 modificó el BAC AY495827 mediante recombinación homóloga en E.coli (Clonaje ET: E. Chiang Lee et al., Genomics 73, 56-65 (2001); Daiguan Yu et al., PNAS 97, 5978-5983 (2000); Muyrers et al., Nucleic Acids Research 27, 1555-1557 (1999); Zhang et al., Nature Biotechnology 18, 1314-1317(2000)) y se  
20 eliminaron los nucleótidos 1 - 107795 y 142832 - 205141. Además se sintetizó un gen bcl-2 humano sintético, bajo el control del promotor kappa 1 del AY495828 (pos. 114284-114570) conectado a la secuencia poliA de la beta globina de conejo. Corriente abajo, se introdujo una casete de  
25 selección con gentamicina flanqueada por dianas FRT mediante PCR de extensión solapada. La casete con bcl-2 - gentamicina se amplificó con cebadores que poseen una homología de 50 pb con el BAC AY495827 modificado (Id. de Sec. N°:1). La

secuencia del nucleótido 134571 - 136019 del BAC AY495827 se intercambió por la casete bcl-2 - gentamicina (Id. de Sec. N°:1) mediante clonaje ET. Los clones positivos se seleccionaron con gentamicina, se analizaron mediante digestiones con enzimas de restricción y se confirmaron mediante secuenciación. A continuación, la casete de selección con gentamicina se eliminó mediante recombinación FLP. La construcción resultante se utilizó para generar los animales transgénicos.

## 10 **Ejemplo 2**

### Construcción de un vector de expresión de inhibidor de la apoptosis con bcl-2 de ratón

El cribaje de bibliotecas genómicas BAC de conejo resultó en la identificación de dos BAC (179L1 y 19602; N° acceso de Gene Bank: AY495827, y AY495828, respectivamente) que contienen los segmento génicos de la cadena ligera K1 de conejo.

Para la construcción de un vector de expresión de inhibidor de la apoptosis específico de linfocito B, se modificó el BAC AY495827 mediante recombinación homóloga en E.coli (ET cloning: (E. Chiang Lee et al., Genomics 73, 56-65 (2001); Daiguan Yu et al., PNAS 97, 5978-5983 (2000); Muyrers et al., Nucleic Acids Research 27, 1555-1557 (1999); Zhang et al., Nature Biotechnology 18, 1314-1317(2000) y se eliminaron los nucleótidos 1 - 107795 y 142832 - 205141. Se sintetizó un gen sintético de bcl-2 de ratón bajo el control del promotor kappa 1 de AY495828 (pos. 114284-1145.70), conectado además a la secuencia poliA de la globina beta de

conejo. Se introdujo corriente abajo, un casete de selección de gentamicina flanqueado por sitios FRT mediante PCR de extensión por solapamiento. El casete de gentamicina bcl-2 se amplificó con cebadores con homologías de 50 pb al BAC  
5 AY495827 modificado (Id. de Sec. N°:1). La secuencia desde el nucleótido 134571 - 136019 en el BAC AY495827 se intercambió frente al casete de gentamicina bcl-2 mediante clonación ET. Se seleccionaron los clones positivos con gentamicina y se analizaron mediante digestión con enzimas  
10 de restricción y se confirmó mediante secuenciación. Posteriormente, el casete de selección de gentamicina se eliminó mediante recombinación por FLP. La construcción resultante se utilizó para generar animales transgénicos.

### **Ejemplo 3**

15 Construcción de un locus de cadena pesada humana (humanizada) que codifica una proteína de fusión que contiene las formas de membrana de IgM e IgG, un péptido 2A autoescindible, y un inhibidor de la apoptosis

Se aislaron clones de BAC y fósmidos que contenían  
20 secuencias del locus de cadena pesada de inmunoglobulina de conejo a partir de bibliotecas genómicas de DNA utilizando sondas específicas para los segmentos génicos constantes, variables, y de unión a la región 3' potenciadora. Los BAC aislados y el fósrido Fos15B se secuenciaron (N° acceso del  
25 Genbank AY386695, AY386696, AY386697, AY386698). Las regiones J y C. de AY386695 y la región CD de AY386696 se intercambiaron con los homólogos humanos correspondientes mediante recombinación homóloga en E.coli mediante clonación



ET (E. Chiang Lee et al., Genomics 73, 56-65 (2001); Daiguan Yu et al., PNAS 97, 5978-5983 (2000); Muirers et al., Nucleic Acids Research 27, 1555-1557 (1999); Zhang et al., Nature Biotechnology 18, 1314-1317(2000)).

5 Los cuatro BAC se recombinaron mediante ligación in vitro y recombinación mediada por Cre para reconstituir un locus de Ig de conejo con secuencias que codifican J, C $\mu$  y C humanas.

Para unir la expresión de bcl-2 a la expresión de IgM e  
10 IgG, la secuencia codificante de bcl-2 se fusionó con la secuencia codificante de los exones M2 de membrana de IgM e IgG con una secuencia codificante para un péptido F2A autoescindible.

Para la inserción de una secuencia que codifica una  
15 proteína de fusión IgG-M2-F2A-bcl-2, se generaron las siguientes construcciones. Las secuencias para la recombinación homóloga se basaron en la secuencia de BAC AY 386696. Se sintetizó un fragmento de DNA (de 5' a 3') que contenía un sitio KpnI, una secuencia idéntica a 50  
20 nucleótidos de C.M2, una secuencia que codifica F2A, una secuencia que codifica una bcl-2 humana, un sitio FRT5, y un sitio EcoRI. Se amplificó el casete de contraselección rpsL.Neo utilizando el plásmido pSC101 rpsL-neo (Genebridges) como plantilla. El cebador corriente arriba  
25 que contenía un sitio EcoRI y un sitio FRT5, el cebador corriente abajo contenía una secuencia idéntica a los 50 nucleótidos corriente abajo de C.M2 y un sitio XhoI. El fragmento sintético y el producto de amplificación por PCR

se ligaron en el vector pcDNA3.1(+), abierto con KpnI y XhoI. El casete ligado (Id. de Sec. N°: 2) se liberó con XhoI y KpnI y se utilizó para la recombinación homóloga en E coli. Tras la transformación del casete en la cepa de E.coli  
5 DH10B que contenía BAC AY 386696 y el plásmido pSC101-BAD-gba-tetra, se indujo la expresión de las recombinasas Reda/ $\beta$ . Posteriormente, se seleccionaron los clones resistentes a kanamicina y se analizaron mediante digestión con enzimas de restricción y análisis parcial de la  
10 secuencia. Finalmente, el gen de resistencia RpsLNeo se eliminó del BAC mediante recombinación mediada por Flp.

El clon BAC resultante se modificó después de la inserción de una secuencia que codifica una proteína de fusión IgM-M2-F2A-bcl2. Las secuencias para la recombinación  
15 homóloga están basadas en la secuencia de BAC AY 386696. El gen rpsL.Neo se amplificó utilizando el plásmido pSC101 rpsL-neo (Genebridges) como plantilla. Los cebadores contienen secuencias idénticas a IgG-M2 y las secuencias flanqueantes de los sitios FRT y FRT2 (Id. de Sec. N°: 3).  
20 El producto de amplificación se insertó en BAC AY 386696 mediante clonación ET. Posteriormente, el casete de selección se sustituyó con un fragmento de DNA que codifica una proteína de fusión IgM-M2-F2A-bcl-2 (Id. de Sec. N°: 4). Este fragmento de DNA se sintetizó conteniendo desde 5' a  
25 3'un sitio EcoRI, un sitio FRT, una secuencia que codifica IgM-M2, una secuencia que codifica F2A y bcl-2, un sitio FRT2 y EcoRI (Id. de Sec. N°: 4). El fragmento sintetizado se escindió con EcoRI y se utilizó para el intercambio del

gen rpsL.Neo con IgM-M2-F2A-bcl-2 mediante recombinación entre los sitios FRT/FRT y FRT2/FRT2 mediada por Flp. Los clones positivos se identificaron mediante análisis por restricción y posterior análisis mediante secuenciación parcial.

El BAC resultante se combinó con BAC que contenían diferentes regiones V. Los BAC pueden combinarse mediante ligación o recombinación. Las construcciones resultantes se utilizaron para la generación de animales transgénicos.

#### 10 **Ejemplo 4**

Generación de ratones transgénicos y conejos que expresan la cadena pesada de inmunoglobulinas humanizadas

Se generaron conejos y ratones transgénicos que contenían loci de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina humanizada y un gen inhibidor de la apoptosis mediante inyección de DNA en el pronúcleo de oocitos fertilizados y la posterior transferencia de embriones en madres adoptivas. Los animales fundadores transgénicos se identificaron mediante PCR. La expresión de inmunoglobulina M y G humana (humanizada) se midió mediante ELISA. La expresión de IgG humanizada fue de 10-20 mg/ml.

#### **Ejemplo 5**

Generación de pollos transgénico que expresan cadena pesada de inmunoglobulinas humanizadas

25 Se generaron pollos transgénicos mediante transferencia génica mediada por testículos. Las construcciones de DNA (50ug) se mezclaron con 250ul de reactivo de lipofección (superfect) en 500ul de NaCl 0,9% y se inyectaron en los

testículos de gallos. Tres a cuatro semanas más tarde se identificaron los gallos con esperma transgénico mediante análisis por PCR y se aparearon con gallinas. Se identificó la descendencia transgénica mediante PCR. La expresión de  
5 IgG humanizada fue de 10-20 mg/ml.

Mientras que la invención está ilustrada mediante referencia a ciertas realizaciones, esta no está limitada. Un experto en la materia entenderá que están disponibles varias modificaciones y que pueden realizarse sin cambios  
10 sustanciales en el modo en que la invención funciona.

**Listado de Secuencias**

&lt;110&gt; BUELOW, Roland

PLATZER, Josef

<120> Supresión de la apoptosis de los linfocitos B en  
 5 animales transgénicos que expresan inmunoglobulinas  
 humanizadas

&lt;130&gt; 39691-0014A US

&lt;140&gt; Pendiente de asignación

&lt;147&gt; 2006-07-28

10 &lt;150&gt; US 60/705,305

&lt;151&gt; 2005-08-03

&lt;160&gt; 20

&lt;170&gt; FastSEQ para Windows versión 4.0

&lt;210&gt; 1

15 &lt;211&gt; 2338

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Secuencia sintética

20 &lt;400&gt; 1

```

acataaatat actgtcttcc aggatcttag agctcaccta aggaaacaag agttcatttg 60
aagtttttaa agtgaacctc agtgactttg ggatgtgaac tctccgagta gaagcatgcg 120
cactgcaggt aaacttgtgc agccctggtc tgagctgggg cagctggaga cacagcccct 180
gggctgagtt ctgagctgcc ctgggccctt cagctgggca cagccctgcc ccgcccctgc 240
tcatttgcac gtccccagag caccacccac ctctctgggc atttaggagc aggctgctcc 300
cgccccatgc aggaggcagt gccaggcagg acccagcatg gcgcacgctg ggagaacagg 360
gtacgataac cgggagatag tgatgaagta catccattat aagctgtcgc agaggggcta 420
cgagtgggat gcgggagatg tgggcgcccgc gcccccgagg gccgcccccg cgccgggcat 480
cttctcctcg cagcccgggc acacgccccca tacagccgca tcccgggacc cggctcgccag 540
gacctcgccg ctgcagaccc cggctgcccc cggcgccgcc gcggggcctg cgctcagccc 600
ggtgccacct gtggtccacc tgacctccgc ccaggccggc gatgacttct cccgccccta 660
ccgccgcgac ttccgagaga tgtccaggca gctgcacctg acgcccctca ccgcgcgggg 720
acgctttgcc acggtggtgg aggagctctt cagggacggg gtgaactggg ggaggattgt 780
ggccttcttt gagttcgggtg gggctcatgtg tgtggagagc gtcaaccggg agatgtcgcc 840
cctggtggac aacatcgccc tgtggatgac tgagtacctg aaccggcacc tgcacacctg 900
gatccaggat aacggaggct gggatgcctt tgtggaactg tacggccccca gcatgcccgc 960
tctgtttgat ttctcctggc tgtctctgaa gactctgctc agtttggccc tgggtgggagc 1020

```

```

ttgcatcacc ctgggtgctt atctgggcca caagtgaatc tttttccctc tgccaaaaat 1080
tatggggaca tcatgaagcc ccttgagcat ctgacttctg gctaataaag gaaattttatt 1140
ttcattgcaa tagtggtgtg gaattttttg tgtctctcac tcggaaggac atatgggagg 1200
gcaaatcatt taaaacatca gaatgagtat ttggtttaga gtttggcaac atatgccgaa 1260
gttcctattc cgaagttcct attctctaga aagtatagga acttctggag ttgtagatcc 1320
tctacgccgg acgcattcgt gccggcatca ccggctgaag gcacgaaccc agttgacata 1380
agcctgttcg gttcgtaaac tghtaatgcaa gtagcgtatg cgctcacgca actggtccag 1440
aaccttgacc gaacgcagcg gtggttaacgg ccgagtgccg gttttcatgg ctgtttatga 1500
ctgttttttt gtacagtcta tgccctcgggc atccaagcag caagcgcgtt acgccgtggg 1560
tcgatgtttg atgttatgga gcagcaacga tgttacgcag cagcaacgat gttacgcagc 1620
agggcagtcg ccctaaaaca aagttaggtg gctcaagtat gggcatcatt cgcacatgta 1680
ggctcggccc tgaccaagtc aaatccatgc gggctgctct tgatcttttc ggtcgtgagt 1740
tcggagacgt agccacctac tcccaacatc agccggactc cgattacctc gggaaacttg 1800
tccgtagtta gacattcatc gcgcttgctg ccttcgacca agaagcgttt gttggcgctc 1860
tcgcggttta cgttctgccc aggtttgagc agccgcgtag tgagatctat atctatgac 1920
tcgcagtcct cggcgagcac cggaggcagg gcattgccac cgcgctcatc aatctcctca 1980
agcatgaggc caacgcgctt ggtgcttatg tgatctacgt gcaagcagat tacggtgacg 2040
atcccgagtg ggtctcttat acaaagtggg gcatacggga agaagtgatg cactttgata 2100
tcgacccaag taccgccacc taacaattcg ttcaagccga ggttgtaaca ctggcagagc 2160
attacgctga cttgacggga cggcggtttt gttgaataaa tcgaactttt gctgagttga 2220

```

```

aggatcagat cagcatctt gaagttccta ttccgaagtt cctattctct agaaagtata 2280
ggaacttcga ttactttta agtagaaatt ttataaaagt gggtaaataga gtaggttt 2338

```

<210> 2

<211> 2383

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

<400> 2

```

ggtacctgaa acacaccatc gctcccgact acaggaacat gatcgggcag ggggccgtga 60
aacagacttt gaattttgac cttctcaagt tggcgggaga cgtggagtcc aaccaggggc 120
ccatggcccc cgccgggcgc actggctatg ataatcgca aattgtcatg aagtatatc 180
actacaagct ctctcaaaga ggatacgagt gggatgcggg ggacgtcggc gctgccccac 240
ctggagctgc gccggctcca ggcattctta gcagccagcc gggccacaca cctcacaccg 300
ctgcctccag ggatccggtg gcacggacca gccctctgca aactcccgcc gccctgagg 360
ctgcagcggg tcccgccttg tcccgggtgc cccctgtggt gcacctcacg ctgcccag 420
cgggcgacga cttcagcagg cgctacagaa gagactttgc cgaaatgtcc cgccagctcc 480
atctgacccc cttcacgcga cgaggagggt tcgccaccgt ggtcgaagaa cttttccgcg 540
acgggtgtgaa ctggggccgc atcgttgctt tttttgagtt cggggggggt atgtgcgtgg 600
aatcagtgaa ccgcgaaatg agtcccttgg tcgacaacat agctctttgg atgacagagt 660
acctgaaccg gcatctgcat acttgatac aggacaacgg aggatgggat gcttttgtg 720
agctgtacgg cccatcaatg cgccccttgt tcgacttcag ctggttgctc ctgaagacgc 780
tcctgagcct cgctcttggt ggcgcctgta tcactttggg cgccatctc ggacataaat 840
aagaagtcc tattccgaag ttctattct tcaaaaggta taggaacttc gaattcatta 900
caccagtgtc agtaagcggg caaagtcggt taatgtcagt ttcaaaacgt ccacccatca 960
ggcctgtgta tgatggcggg atcgttgat atttcttgac accttttcgg catcgcccta 1020
aaattcggcg tcctcatatt gtgtgaggac gttttattac gtgtttacga agcaaaagct 1080
aaaaccagga gctatttaac ggcaacagtt aaccagctgg tacgcaaac acgtgctcgc 1140
aaagtgcga aaagcaacgt gcctgcgctg gaagcatgcc cgcaaaaacg tggcgtatgt 1200
actcgtgtat atactaccac tcctaaaaaa ccgaactccg cgctgcgtaa agtatgccgt 1260
gttcgtctga ctaacggttt cgaagtgact tcctacatcg gtggtgaagg tcacaacctg 1320

```



```

caggagcact ccgtgatcct gatccgtggc ggctcgtgtta aagacccccc ggggtgttcgt 1380
taccacaccg tacgtgggtg gcttgactgc tccggcggtta aagaccgtaa gcaggctcgt 1440
tccaagtatg gcgtgaagcg tcctaaggct taaggaggac aatcatgatt gaacaagatg 1500
gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct attcggctat gactgggcac 1560
aacagacaat cggctgctct gatgccggcg tgttccggct gtcagcgag gggcgcccg 1620
ttctttttgt caagaccgac ctgtccgggt ccctgaatga actgcaggac gaggcagcgc 1680
ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc cttgcgcagc tgtgctcgac gttgtcactg 1740
aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg aagtgcgggg gcaggatctc ctgtcatctc 1800
accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc 1860
ttgatccggc tacctgcca ttcgaccacc aagcgaaaca tcgcatcgag cgagcacgta 1920
ctcggatgga agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat caggggctcg 1980
cgccagccga actgttcgcc aggttcaagg cgcgcagcgc cgacggcgag gatctcgtcg 2040
tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatgggtgga aaatggccgc ttttctggat 2100
tcacgcactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca ggacatagcg ttggctaccc 2160
gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaaat gggctgaccg cttcctcgtg cttacggta 2220
tcgcccgtcc cgattcgag cgcacgcct tctatgcct tcttgacgag ttcttctgag 2280
aagttcctat tccgaagttc ctattcttca aaaggatatag gaacttcgc cttcgttctc 2340
acagcctgcc tccctggcca gcaggagccc ccgcctcctc gag 2383

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1579

&lt;212&gt; DNA

5 &lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Secuencia sintética

&lt;400&gt; 3

```

cgtccattcc caacacatga acagcatctc acgccacctc tgttgccctgc gaagttccta 60
ttccgaagtt cctattctct acttagtata ggaacttcat tacaccagtg tcagtaagcg 120
ggcaaagtcg gttaatgtca gtttcaaaac gtccacccat caggcctggg gatgatggcg 180
ggatcgttgt atatttcttg acaccttttc ggcacgcgcc taaaattcgg cgtcctcata 240
ttgtgtgagg acgttttatt acgtgtttac gaagcaaaag ctaaaaccag gagctattta 300
atggcaacag ttaaccagct ggtacgcaaa ccacgtgctc gcaaaagttgc gaaaagcaac 360

```

```

gtgcctgcgc tggaaagcatg cccgcaaaaa cgtggcgtat gtactcgtgt atatactacc 420
actcctaataa aaccgaactc cgcgctgcgt aaagtatgcc gtgttcgtct gactaacggg 480
ttcgaagtga cttcctacat cgggtgtgaa ggtcacaacc tgcaggagca ctccgtgatc 540
ctgatccgtg gcggtcgtgt taaagacctc ccgggtgttc gttaccacac cgtacgtggg 600
gcgcttgact gctccggcgt taaagaccgt aagcaggctc gttccaagta tggcgtgaag 660
cgtcctaagg cttaaggagg acaatcatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 720
cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct 780
ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgcgc ggttctttt gtcaagaccg 840
acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca 900
cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgctac tgaagcggga agggactggc 960
tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga 1020
aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc 1080
cattcgacca ccaagcgaaa catcgcacg agcagacagc tactcggatg gaagccgggt 1140
ttgtcgatca ggaatgatct gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg 1200
ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat gcgatgcct 1260
gcttgccgaa tatcatgggt gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc 1320
tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc 1380
ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg tatcggcgt cccgattcgc 1440
agcgcattcg cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agaagttcct attccgaagt 1500
tcctattctc tagaaagtat aggaacttcc ctgagaagga tgtcggaggc caagagacaa 1560
gcccgccgtg gccctgctc

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 902

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Secuencia artificial

5

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Secuencia sintética

&lt;400&gt; 4

```

gaattcgaag ttctatttcc gaagttccta ttcttactt agtataggaa cttcaggtga 60
agcagacttt gaattttgac cttctcaagt tggcgggaga cgtggagtcc aaccagggc 120
ccatggccca cgccgggagc actggctatg ataatcgca aattgtcatg aagtataatc 180
actacaagct ctctcaaaga ggatacgagt gggatgcggg ggacgtcggc gcagctccac 240
ctggagctgc gccggccccct ggcatcttta gcagccagcc gggccacaca cctcacaccg 300
ctgcctccag ggatccggtg gcacggacca gccctctgca aactccgcc gccctgggg 360
ctgcagcggg tcccgcttg tcccggtgc cccctgtggt gcacctcacg ctgcggcagg 420
cgggagacga cttcagcagg cgctacagaa gagactttgc cgaaatgtcc cgccagctcc 480
atctgacccc cttcaccgca cgagggaggt tcgccaccgt ggtcgaagaa cttttccgcg 540
acggtgtgaa ctggggccgc atcgttgcct tttttgagtt cggggggggt atgtgcgtgg 600
aatcagttaa ccgcgaaatg agtcccttgg tcgacaacat agctctttgg atgacagagt 660
acctgaaccg gcatctgcat acttgatac aggacaacgg aggatgggat gcttttgttg 720
agctgtacgg cccatcaatg cgccccttgt tcgacttcag ctggttgtcc ctgaagacgc 780
tcctgagcct cgctcttgtg ggcgcctgta tcactttggg cgctatctc ggacataaat 840
aagaagttcc tattccgaag ttctatttct ctgaaaagta taggaacttc ctcgaggaat 900
tc

```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 226

10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; oryctolagus

&lt;400&gt; 5

```

Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met
 1          5          10          15
Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala
          20          25          30
Gly Asp Ala Gly Ala Ala Ser Ala Pro Gly Val Phe Ser Ser Gln Pro
          35          40          45
Ala Pro Ala Ala Pro Arg Asp Pro Ala Ala Arg Thr Ser Pro Pro Pro
          50          55          60
Pro Pro Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val
          65          70          75          80
His Leu Thr Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg
          85          90          95
Arg Asp Phe Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr
          100          105          110

```



Ala	Arg	Gly	Arg	Phe	Ala	Thr	Val	Val	Glu	Glu	Leu	Phe	Arg	Asp	Gly
		115					120				125				
Val	Asn	Trp	Gly	Arg	Ile	Val	Ala	Phe	Phe	Glu	Phe	Gly	Gly	Val	Met
	130					135					140				
Cys	Val	Glu	Ser	Val	Asn	Arg	Glu	Met	Ser	Pro	Leu	Val	Asp	Asn	Ile
145					150					155					160
Ala	Leu	Trp	Met	Thr	Glu	Tyr	Leu	Asn	Arg	His	Leu	His	Thr	Trp	Ile
				165					170					175	
Gln	Asp	Asn	Gly	Gly	Trp	Asp	Ala	Phe	Val	Glu	Leu	Tyr	Gly	Pro	Ser
			180					185					190		
Val	Arg	Pro	Leu	Ser	Asp	Phe	Ser	Trp	Val	Ser	Leu	Lys	Thr	Leu	Phe
		195					200					205			
Ser	Leu	Ala	Leu	Ile	Gly	Ala	Cys	Ile	Thr	Leu	Gly	Ala	Tyr	Leu	Gly
	210					215					220				
His	Lys														
225															

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 788

&lt;212&gt; DNA

5 &lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Secuencia sintética

&lt;400&gt; 6

```

aggtgaagca gactttgaat tttgaccttc tcaagttggc gggagacgtg gagtccaacc 60
cagggcccat ggcccacgcc gggcgccactg gctatgataa tcgcgaaatt gtcatagaagt 120
atattcacta caagctctct caaagaggat acgagtggga tgcgggggac gtcggcgag 180
ctccacctgg agctgcgccg gcccctggca tctttagcag ccagccgggc cacacacctc 240
acaccgctgc ctccagggat ccggtggcac ggaccagccc tctgcaaact cccgccgccc 300
ctggggctgc agcgggtccc gccttgctcc cggtgcccc tgtggtgcac ctacgctgc 360
ggcaggcggg cgacgacttc agcaggcgct acagaagaga cttgcccga atgtcccgcc 420
agctccatct gacccccttc accgcacgag ggaggttcgc caccgtggtc gaagaacttt 480
tccgcgacgg tgtgaactgg ggccgcacgc ttgcctttt tgagttcggg ggggttatgt 540
gcgtggaatc agtgaaccgc gaaatgagtc ccttggtcga caacatagct ctttgatga 600
cagagtacct gaaccggcat ctgcatactt ggatacagga caacggagga tgggatgctt 660
ttgttgagct gtacggccca tcaatgcgcc ccttgttcga cttcagctgg ttgtccctga 720
agacgtcctt gagcctcgct cttgtgggcg cctgtatcac ttggggcgcc tatctcggac 780
ataaataa
788

```

&lt;210&gt; 7

10 &lt;211&gt; 788

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Secuencia sintética

&lt;400&gt; 7

```

aggtgaagca gactttgaat tttgaccttc tcaagttggc gggagacgtg gagtccaacc 60
cagggcccat ggcgcacgct gggagaacag ggtacgataa ccgggagata gtgatgaagt 120
acatccatta taagctgtcg cagaggggct acgagtggga tgcgggagat gtgggcgccg 180
cgccccggg ggccgcccc gcgccgggca tcttctctc gcagcccggg cacacgcccc 240
atacagccgc atccccggac ccggtcgcca ggacctcgcc gctgcagacc ccggctgccc 300
ccggcgccgc cgcggggcct gcgctcagcc cggtgccacc tgtgtgccac ctgacctctc 360
gccaggccgg cgacgacttc tcccgcgcgt accgcccga cttcgccgag atgtccaggc 420
agctgcacct gacgcccttc accgcgcggg gacgcttgc cacggtggtg gaggagctct 480
tcagggacgg ggtgaactgg gggaggattg tggccttctt tgagttcggg ggggtcatgt 540
gtgtggagag cgtcaaccgg gagatgtcgc ccctgggtga caacatcgcc ctgtggatga 600
ctgagtacct gaaccggcac ctgcacacct ggatccagga taacggaggc tgggatgcct 660
ttgtggaact gtacggcccc agcatgcggc ctctgtttga tttctcttgg ctgtctctga 720
agactctgct cagtttggcc ctggtgggag cttgcatcac cctgggtgcc tatctgggcc 780
acaagtga

```

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 869

&lt;212&gt; DNA

5 &lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; secuencia sintética

&lt;400&gt; 8

```

aggtgaagtg gatcttctcg tccgtggtgg agctgaaaca caccatcgct cccgactaca 60
ggaacatgat cgggcagggg gccgtgaaac agactttgaa ttttgacctt ctcaagttgg 120
cgggagacgt ggagtccaac ccagggccca tggcccacgc cgggcgcact ggctatgata 180
atcgcgaaat tgtcatgaag tatattcact acaagctctc tcaaagagga tacgagtggg 240
atgcggggga cgtcggcgct gccccacctg gagctgcgcc ggctccaggc atcttttagca 300
gccagccggg ccacacacct cacaccgctg cctccaggga tccggtggca cggaccagcc 360
ctctgcaaac tcccgcgcgc cctggggctg cagcgggtcc cgccttgtec ccggtgcccc 420
ctgtggtgca cctcacgctg cggcaggcgg gcgacgaact cagcaggcgc tacagaagag 480
actttgccga aatgtcccgc cagctccatc tgacccccct caccgcacga gggaggttcg 540
ccaccgtggt cgaagaactt ttccgcgacg gtgtgaactg gggccgcatac gttgcctttt 600
ttgagttcgg gggggttatg tgcgtggaat cagtgaaccg cgaaatgagt cccttggtcg 660
acaacatagc tctttggatg acagagtacc tgaaccggca tctgcatact tggatacagg 720
acaacggagg atgggatgct tttgttgagc tgtacggccc atcaatgcgc cccttgttcg 780
acttcagctg gttgtccctg aagacgctcc tgagcctcgc tcttgtgggc gcctgtatca 840
ctttgggcgc ctatctcgga cataaataa
869

```

&lt;210&gt; 9

10 &lt;211&gt; 809

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; secuencia sintética

15 &lt;400&gt; 9

```

aggtgaagcg agcaaagcga ccggtgaaac agactttgaa ttttgaacct ctcaagttgg 60
cgggagacgt ggagtccaac ccagggccca tggcgcacgc tgggagaaca gggtacgata 120
accgggagat agtgatgaag tacatccatt ataagctgtc gcagaggggc tacgagtggg 180
atgcgggaga tgtgggcgcc gcgcccccg gggccgccc cgcgccgggc atcttctcct 240
cgacgcccgg gcacacgccc catacagccg catcccggga cccggtcgcc aggacctcgc 300
cgctgcagac cccggctgcc cccggcgccg ccgcggggccc tgcgctcagc ccggtgccac 360
ctgtggtcca cctgaccctc cgccaggccg gcgacgactt ctcccgcgc taccgccgcg 420
acttcgccga gatgtccagg cagctgcacc tgacgccctt caccgcgcgg ggacgctttg 480
ccacggtggg ggaggagctc ttcagggacg ggggtgaactg ggggaggatt gtggccttct 540
ttgagttcgg tggggtcatg tgtgtggaga gcgtcaaccg ggagatgtcg cccctggtgg 600
acaacatcgc cctgtggatg actgagtacc tgaaccggca cctgcacacc tggatccagg 660
ataacggagg ctgggatgcc tttgtggaac tgtacggccc cagcatgcgg cctctgtttg 720
atttctcctg gctgtctctg aagactctgc tcagtttggc cctggtggga gcttgcataca 780
ccctgggtgc ctatctgggc cacaagtga
809

```

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 884

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Secuencia artificial

5

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; secuencia sintética

&lt;400&gt; 10

```

aggtgaagtg gatcttctcg tccgtggtgg agctgaaaca caccatcgct cccgactaca 60
ggaacatgat cgggcagggg gcccgagcaa agcgaccggt gaaacagact ttgaattttg 120
accttctcaa gttggcggga gacgtggagt ccaaccagg gcccatggcc cagcggggc 180
gcactggcta tgataatcgc gaaattgtca tgaagtatat tcactacaag ctctctcaaa 240
gaggatacga gtgggatgcg ggggacgtcg gcgctgcccc acctggagct gcgccggctc 300
caggcatctt tagcagccag ccgggccaca caccacacac cgctgcctcc agggatccgg 360
tggcacggac cagccctctg caaactcccc ccgcccctgg ggctgcagcg ggtcccgcct 420
tgtccccggt gccctctgtg gtgcacctca cgctgcggca ggcgggcgac gacttcagca 480
ggcgctacag aagagacttt gccgaaatgt cccgccagct ccatctgacc cccttcaccg 540
cacgagggag gttcgccacc gtggtcgaag aacttttccg cgacggtgtg aactggggcc 600
gcacgtgtgc cttttttgag ttcggggggg ttatgtgctg ggaatcagtg aaccgcgaaa 660
tgagtccctt ggtcgacaac atagctcttt ggatgacaga gtacctgaac cggcatctgc 720

```

```

atacttggat acaggacaac ggaggatggg atgcttttgt tgagctgtac ggcccatcaa 780
tgcgccccct gttcgacttc agctggttgt ccctgaagac gctcctgagc ctcgctcttg 840
tgggcgcctg tatcactttg ggcgcctatc tcggacataa ataa
884

```

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 239

10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo

&lt;400&gt; 11



-75 -

```

Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met
 1      5      10      15
Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala
      20      25      30
Gly Asp Val Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ile
      35      40      45
Phe Ser Ser Gln Pro Gly His Thr Pro His Pro Ala Ala Ser Arg Asp
 50      55      60
Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Leu Gln Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala
 65      70      75      80
Ala Ala Gly Pro Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Ala
      85      90      95
Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Gly Asp Phe
      100      105      110
Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly
      115      120      125
Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp
      130      135      140
Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu
      145      150      155      160
Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp
      165      170      175
Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn
      180      185      190
Gly Gly Trp Asp Ala Phe Val Glu Leu Tyr Gly Pro Ser Met Arg Pro
      195      200      205
Leu Phe Asp Phe Ser Trp Leu Ser Leu Lys Thr Leu Ser Leu Ala
      210      215      220
Leu Val Gly Ala Cys Ile Thr Leu Gly Ala Tyr Leu Ser His Lys
      225      230      235

```

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 199

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus

5 &lt;400&gt; 12

```

Met Ala Gln Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met
 1      5      10      15
Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala
      20      25      30
Gly Asp Ala Asp Ala Ala Pro Leu Gly Ala Ala Pro Thr Pro Gly Ile
      35      40      45
Phe Ser Phe Gln Pro Glu Ser Asn Pro Met Pro Ala Val His Arg Asp
 50      55      60
Met Ala Ala Arg Thr Ser Pro Leu Arg Pro Leu Val Ala Thr Ala Gly
 65      70      75      80
Pro Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Thr Leu Arg Arg
      85      90      95
Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Arg Asp Phe Ala Glu Met
      100      105      110
Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly Arg Phe Ala
      115      120      125
Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile
      130      135      140
Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu Ser Val Asn
      145      150      155      160

```

-76 -

Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp Met Thr Glu  
 Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn Gly Gly Trp  
 Val Gly Ala Cys Leu Val Glu

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 236

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus

5

&lt;400&gt; 13

Met Ala Gln Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met  
 Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala  
 Gly Asp Ala Asp Ala Ala Pro Leu Gly Ala Ala Pro Thr Pro Gly Ile  
 Phe Ser Phe Gln Pro Glu Ser Asn Pro Met Pro Ala Val His Arg Asp  
 Met Ala Ala Arg Thr Ser Pro Leu Arg Pro Leu Val Ala Thr Thr Gly  
 Pro Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Thr Leu Arg Arg  
 Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Arg Asp Phe Ala Glu Met  
 Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly Arg Phe Ala  
 Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile  
 Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu Ser Val Asn  
 Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp Met Thr Glu  
 Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn Gly Gly Trp  
 Asp Ala Phe Val Glu Leu Tyr Gly Pro Ser Met Arg Pro Leu Phe Asp  
 Phe Ser Trp Leu Ser Leu Lys Thr Leu Leu Ser Leu Ala Leu Val Gly  
 Ala Cys Ile Thr Leu Gly Ala Tyr Leu Gly His Lys

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 154

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus

10

&lt;400&gt; 14

- 77 -

```

Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Thr Gly Asp
 1      5      10      15
Glu Asp Ser Ala Pro Leu Arg Ala Ala Pro Thr Pro Gly Ile Phe Ser
 20      25      30
Phe Gln Pro Glu Ser Asn Arg Thr Pro Ala Val His Arg Asp Thr Ala
 35      40      45
Ala Arg Thr Ser Pro Leu Arg Pro Leu Val Ala Asn Ala Gly Pro Ala
 50      55      60
Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Thr Leu Arg Arg Ala Gly
 65      70      75      80
Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Arg Asp Phe Ala Glu Met Ser Ser
 85      90      95
Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly Arg Phe Ala Thr Val
 100     105     110
Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala
 115     120     125

```

```

Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu Ser Val Asn Arg Glu
 130     135     140
Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu
 145     150

```

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 235

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Felis

5 &lt;400&gt; 15

```

Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met
 1      5      10      15
Lys Tyr Ile His Tyr Glu Leu Pro Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala
 20      25      30
Gly Asp Ala Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ile
 35      40      45
Phe Ser Ser Gln Pro Gly Arg Thr Pro Ala Pro Ala Arg Thr Ser Pro
 50      55      60
Pro Pro Pro Pro Val Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Pro
 65      70      75      80
Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Thr Leu Arg Gln Ala
 85      90      95
Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Arg Asp Phe Ala Glu Met Ser
 100     105     110
Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly Arg Phe Ala Thr
 115     120     125
Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val
 130     135     140
Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu Gly Val Asn Arg
 145     150     155     160
Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp Met Thr Glu Tyr
 165     170     175
Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn Gly Gly Trp Asp
 180     185     190
Ala Phe Val Glu Leu Tyr Gly Pro Ser Met Gln Pro Leu Phe Asp Phe
 195     200     205
Ser Trp Leu Ser Leu Lys Ala Leu Leu Ser Leu Ala Leu Val Gly Ala
 210     215     220
Cys Ile Thr Leu Gly Ala Tyr Leu Gly His Lys
 225     230     235

```

- 78 -

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 236

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Canis

5

&lt;400&gt; 16

```

Met Ala Gln Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met
 1      5      10      15
Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Val
      20      25      30
Gly Asp Val Asp Ala Ala Pro Leu Gly Ala Ala Pro Thr Pro Gly Ile
      35      40      45
Phe Ser Phe Gln Pro Glu Ser Asn Pro Thr Pro Ala Val His Arg Asp
      50      55      60
Met Ala Ala Arg Thr Ser Pro Leu Arg Pro Ile Val Ala Thr Thr Gly
65      70      75      80
Pro Thr Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Thr Leu Arg Arg
      85      90      95
Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Arg Asp Phe Ala Glu Met
      100      105      110
Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly Arg Phe Ala
      115      120      125
Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile
130      135      140

```

```

Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu Ser Val Asn
145      150      155      160
Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp Met Thr Glu
      165      170      175
Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn Gly Gly Trp
      180      185      190
Asp Ala Phe Val Glu Leu Tyr Gly Pro Thr Met Gln Pro Leu Phe Asp
      195      200      205
Phe Ser Trp Leu Ser Leu Lys Ala Leu Leu Ser Leu Ala Leu Val Gly
      210      215      220
Ala Cys Ile Thr Leu Gly Ala Tyr Leu Gly His Lys
225      230      235

```

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 229

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bos

10

&lt;400&gt; 17

- 79 -

```

Met Ala His Ala Gly Gly Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met
 1      5      10      15
Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala
      20      25      30
Gly Asp Ala Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ile
      35      40      45
Leu Ser Ser Gln Pro Gly Arg Thr Pro Ala Pro Ser Arg Thr Ser Pro
      50      55      60
Pro Pro Pro Pro Ala Ala Ala Ala Gly Pro Ala Pro Ser Pro Val Pro
      65      70      75
Pro Val Val His Leu Thr Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg
      85      90      95
Arg Tyr Arg Arg Asp Phe Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr
      100      105      110
Pro Phe Thr Ala Arg Glu Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe
      115      120      125
Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Glu Phe Gly
      130      135      140
Gly Val Met Cys Val Glu Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val
      145      150      155
Asp Ser Ile Ala Leu Trp Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His
      165      170      175
Thr Trp Ile Gln Asp Asn Gly Gly Trp Asp Ala Phe Val Glu Leu Tyr
      180      185      190
Gly Pro Ser Met Arg Pro Leu Phe Asp Phe Ser Trp Leu Ser Leu Lys
      195      200      205
Ala Leu Leu Ser Leu Ala Leu Val Gly Ala Cys Ile Thr Leu Gly Ala
      210      215      220
Tyr Leu Gly His Lys
225

```

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 236

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Cricetulus

5 &lt;220&gt;

&lt;221&gt; Variante

&lt;222&gt; 215

&lt;223&gt; xaa = Cualquier aminoácido

&lt;400&gt; 18

```

Met Ala Gln Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met
 1      5      10      15
Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Val
      20      25      30
Gly Asp Val Asp Ala Ala Pro Leu Gly Ala Ala Pro Thr Pro Gly Ile
      35      40      45
Phe Ser Phe Gln Pro Glu Ser Asn Pro Thr Pro Ala Val His Arg Asp
      50      55      60
Met Ala Ala Arg Thr Ser Pro Leu Arg Pro Ile Val Ala Thr Thr Gly
      65      70      75      80

```



- 80 -

```

Pro Thr Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Thr Leu Arg Arg
85 90 95
Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Arg Asp Phe Ala Glu Met
100 105 110
Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly Arg Phe Ala
115 120 125
Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile
130 135 140
Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu Ser Val Asn
145 150 155 160
Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp Met Thr Glu
165 170 175
Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn Gly Gly Trp
180 185 190
Asp Ala Phe Val Glu Leu Tyr Gly Pro Ser Val Arg Pro Leu Phe Asp
195 200 205
Phe Ser Trp Leu Ser Leu Xaa Thr Leu Leu Asn Leu Ala Leu Val Gly
210 215 220
Ala Cys Ile Thr Leu Gly Thr Tyr Leu Gly His Lys
225 230 235

```

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 233

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Gallus

5 &lt;400&gt; 19

```

Met Ala His Pro Gly Arg Arg Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Leu
1 5 10 15
Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Asp Trp Ala Ala
20 25 30
Gly Glu Asp Arg Pro Pro Val Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Ala
35 40 45
Pro Ala Ala Val Ala Ala Ala Gly Ala Ser Ser His Arg Pro Glu
50 55 60
Pro Pro Gly Ser Ala Ala Ala Ser Glu Val Pro Pro Ala Glu Gly Leu
65 70 75 80
Arg Pro Ala Pro Gly Val His Leu Ala Leu Arg Gln Ala Gly Asp
85 90 95
Glu Phe Ser Arg Tyr Gln Arg Asp Phe Ala Gln Met Ser Gly Gln
100 105 110
Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala His Gly Arg Phe Val Ala Val Val
115 120 125
Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe
130 135 140
Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu Ser Val Asn Arg Glu Met
145 150 155 160
Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Thr Trp Met Thr Glu Tyr Leu Asn
165 170 175
Arg His Leu His Asn Trp Ile Gln Asp Asn Gly Gly Trp Asp Ala Phe
180 185 190
Val Glu Leu Tyr Gly Asn Ser Met Arg Pro Leu Phe Asp Phe Ser Trp
195 200 205
Ile Ser Leu Lys Thr Ile Leu Ser Leu Val Leu Val Gly Ala Cys Ile
210 215 220
Thr Leu Gly Ala Tyr Leu Gly His Lys
225 230

```

<210> 20

<211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> secuencia sintética

<400> 20

Asp	Ala	Phe	Val	Glu	Leu	Tyr	Gly	Pro	Ser	Val	Arg	Pro	Leu	Ser	Asp
1				5					10					15	
Phe	Ser	Trp	Val	Ser	Leu	Lys	Thr	Leu	Phe	Ser	Leu	Ala	Leu	Ile	Gly
			20					25					30		
Ala	Cys	Ile	Thr	Leu	Gly	Ala	Tyr	Leu	Gly	His	Lys				
		35					40								

**Reivindicaciones**

1. Un animal transgénico no humano sometido a linfopoyesis a corto plazo que comprende al menos una construcción transgénica que comprende el inhibidor de la apoptosis de mamíferos bcl-2, un transgén controlado por un promotor/ potenciador específico de linfocitos B.

2. Un animal transgénico no humano sometido a linfopoyesis a corto plazo que comprende al menos una construcción transgénica que comprende el inhibidor de la apoptosis de mamíferos bcl-2, un transgén controlado por un promotor/ potenciador específico de linfocitos B y al menos una inmunoglobulina exógena o locus transgénica de una cadena de inmunoglobulina.

3. El animal transgénico no humano de la reivindicación 2 en el que dicha inmunoglobulina exógena o cadena de inmunoglobulina es una secuencia de una cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina humana(humanizada).

4. El animal transgénico no humano de la reivindicación 1 o 2 seleccionado del grupo que consiste en conejos, aves, pollos, ovejas, cabras, vacas, cerdos, caballos y burros.

5. Una construcción de expresión transgénica para su utilización en un animal transgénico no humano sometido a linfopoyesis a corto plazo, que comprende un transgén que codifica una proteína de fusión que comprende secuencias de polipéptido en el siguiente orden: a) una inmunoglobulina o cadena de inmunoglobulina; b) un péptido autoescindible; c) el inhibidor de la apoptosis de mamíferos bcl-2 y un promotor específico de linfocitos B de dicho animal

transgénico no humano sometido a linfopoyesis a corto plazo; y opcionalmente, d) una diana de escisión por una proteasa entre a) y b).

5 6. La construcción de expresión transgénica de la reivindicación 5 en la que dicha diana de escisión por una proteasa se selecciona de entre el grupo que consiste en las dianas de las proteasas de aspártico, proteasas de cisteína, metaloproteasas, proteasas de serina y proteasas de treonina.

10 7. La construcción de expresión transgénica de la reivindicación 5 en la que dicha diana de escisión por una proteasa es la diana de escisión de la furina.

15 8. La construcción de expresión transgénica de la reivindicación 5 en la que dicho fragmento de inmunoglobulina es un fragmento de una cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina humana (humanizada).

9. La construcción de expresión transgénica de la reivindicación 5 en la que dicho péptido autoescindible se deriva de los péptidos virales 2A/ 2B o tipo 2A/ 2B.

20 10. La construcción de expresión transgénica de la reivindicación 9 en la que dicho virus se selecciona de entre el grupo que consiste en la familia de virus picornaviridae, familia de virus de la rinitis A equina (ERAV), familia de virus de insecto tipo picornavirus y de  
25 la familia de rotavirus de tipo C.

11. La construcción de expresión transgénica de la reivindicación 10 en la que dicho virus se selecciona de entre el grupo que consiste en el virus de la fiebre aftosa

(FMDV), el virus de la rinitis A equina (ERAV) y el virus asigna de Thosea (TaV).

12. La construcción de expresión transgénica de las reivindicaciones 1 a 11 en la que dicho bcl-2 de mamífero se  
5 selecciona de entre el grupo que consiste en el bcl-2 humano, bcl-2 murino y bcl-2 de conejo.

13. Una célula huésped aislada transformada con la construcción de expresión transgénica de la reivindicación 5 para su utilización en un animal transgénico no humano  
10 sometido a linfopoyesis a corto plazo.

14. Un método para potenciar de forma selectiva la expresión de una inmunoglobulina exógena o cadena de inmunoglobulina en un linfocito B exógeno de un animal transgénico no humano sometido a linfopoyesis a corto plazo,  
15 que comprende la introducción en dicho animal de una construcción transgénica que codifica una proteína de fusión que comprende unas secuencias polipeptídicas en el siguiente orden: a) una inmunoglobulina o cadena de inmunoglobulina; b) un péptido autoescindible; c) el inhibidor de la  
20 apoptosis de mamíferos bcl-2, y opcionalmente; d) una diana de escisión por una proteasa entre a) y b), en el que se potencian la supervivencia de la célula B exógena y la producción de la inmunoglobulina exógena.

15. El método de la reivindicación 14 en el que dicha  
25 inmunoglobulina exógena o cadena de inmunoglobulina es una cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina humana (humanizada).

16. El método de la reivindicación 14 en el que dicha

diana de escisión por una proteasa se selecciona de entre el grupo que consiste en las dianas de las proteasas de aspártico, proteasas de cisteína, metaloproteasas, proteasas de serina y proteasas de treonina.

5           17. El método de la reivindicación 14 en el que dicha diana de escisión por una proteasa es la diana de escisión de la furina.

          18. El método de la reivindicación 14 en el que dicho gen de un péptido autoescindible se obtiene del 2A/ 2B o  
10       tipo 2A/ 2B viral.

          19. El método de la reivindicación 14 en el que dicho virus se selecciona de entre el grupo que consiste en la familia de virus picornaviridae, la familia de virus de la rinitis A equina (BRAY), la familia de virus de insectos  
15       tipo picornavirus y de la familia de rotavirus tipo C.

          20. El método de la reivindicación 14 en el que dicho virus se selecciona de entre el grupo que consiste en el virus de la fiebre aftosa (FMDV), virus de la rinitis A equina (ERAV) y el virus asina de Thosa (TaV).

20           21. El método de la reivindicación 14 en el que dicho animal transgénico no humano se selecciona de entre el grupo que consiste en roedores, primates, conejos, aves, vacas, cerdos, ovejas, cabras, caballos y burros.

          22. Un animal transgénico no humano sometido a  
25       linfopoyesis a corto plazo que comprende al menos una construcción transgénica que codifica una proteína de fusión que comprende unas secuencias polipeptídicas en el siguiente orden: a) una inmunoglobulina o cadena de inmunoglobulina;

b) un péptido autoescindible; c) el inhibidor de la apoptosis de mamíferos bcl-2, y opcionalmente; d) una diana de escisión por una proteasa entre a) y b), en el que se expresa dicha proteína de fusión.

- 5           23. El animal transgénico no humano de la reivindicación 22 en el que dicho animal se selecciona de entre el grupo que consiste en roedores, primates, conejos, aves, vacas, cerdos, ovejas, cabras, caballos y burros.

FIG. 1

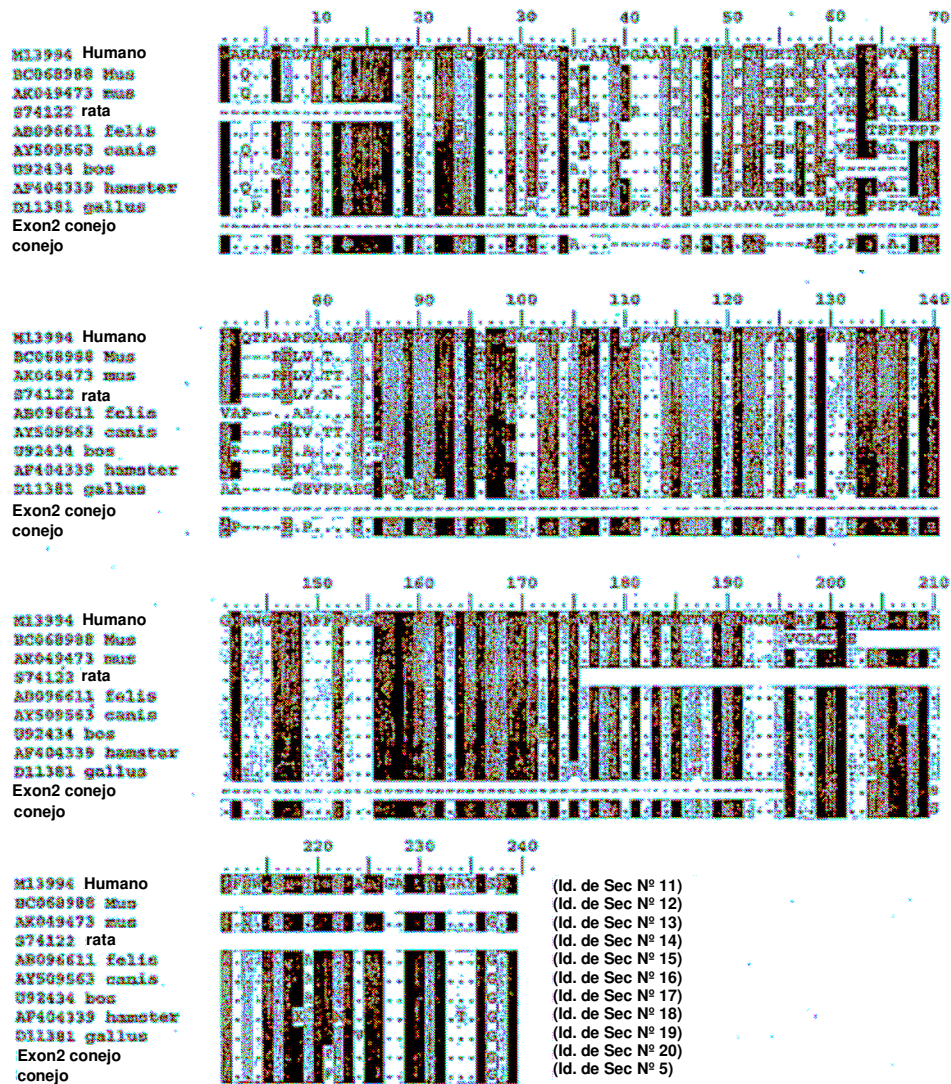




FIG.2 (ID. DE SEC. N°:1)



acataaataatactgtctccaggatcttagagctcacotaaggaacaagagttcaattgaagttttaaagtgaacctcagtgactttgggatgtgaact  
ctccgagtagaagcatgctgactgcaggtaaaattgtgcagccctggtctgagctggggcagctggagacacagcccctgggtgagttctgag  
tgccotgggcccctcagctgggcacagccctgcccgcctctgtcatttgcagctcccagagcaccaccacotctctggcatttaggagcag  
gctgtcccccccattgcaggaggcagtgccaggcaggaccagcatggcgacgctgggagacacagggtacgataaccgggagatagtgtat  
gaagtacatccattataagctgtcgcagaggggtacagtgaggatcggggagatgtggggcggcgcccccggggggcccccggcggcgg  
gcatcttctctcgcagcccgggcacacgcccatacagccgcacccgggacccggctgccaggacctggcgctgcagaccccggctgccc  
ccggcgccggcgggggcctggctcagcccggtgccacctgtgtccacctgacctccggcagggcgccgacgacttctccggcctacc  
ggcgcgacttgcggagatgtccaggcagctgcacctgacgcccctaccgcggggacgcttggccaggtgggtggaggagctcttcaggga  
cggggggaactgggggggagttgtgcttctttagttcgggtgggtcatgtgtgtggagagcgtcaaccgggagatgtgcccctggtggaca  
acatcgccctgtgtgtagtactgagtcctgaaccggcacctgcacacctggaatcaggataacggaggctgggatgctttgtggaactgtacggc  
cccagcatcgccgctctgtttgattctctggtctctctgaagaactctgctcagtttggccctggtggagcttgcacacctgggtgctatctgg  
ggcacaagtgaatcttttccctctgcccataaataatggggacatcatgaagcccttgagcatctgacttctgctaataaaggaaatttatttcattgc  
aatagtgtgttggaattttttgtctctcactcgggaaggacatatgggagggcacaatcatttaaacatcagaatgagtatttgggttagagtttgcaa  
catatgccgaagtctctatccgaagttcctattctctagaagataggaacttctggagttgtagatcctctacgccggacgcatctggccggcatc  
accggctgaaggcaggaaccagttgacataagcctgttcgggttcgtaaacgtgaatgcaagtagcgtatgcgctcagcgaactgtccagaacctt  
gaccgaacgacgggtggttaacggcgagtgccggttttcatgecttattatgactgtttttgtacagttatgcccgggcatccaagcagcaag  
cgcgltacggcggtgggtcgtgtttgatgttatggagcagcaacgaigttaacgcagcagcaacgatgttacgcagcagggcagtcgccotaaaca  
aagttagggtgctcaagtatgggcatcttctgcacatgtaggctcggccctgaccaagtcacatccatgcgggctgctcttgaatcttctggctgtgag  
ttcggagagtagccacctactcccaacatcagccggactccgattacctcgggaacttgcctcgtagtagaacattcagtcgcttgccttga  
ccaagaagcgggtgttggcgtctcggcggttacgttctgcaggggtttagcagccggctagtgagatctatatctatgactcgcagctccggcg  
agcaccggaggcagggcattggcaaccgctcatcaatctctcaagcatgaggccaacgcgttgggtgttatgtgatctacgtgcaagcagatt  
acggtagcatcccgagtggtctctatacaagttgggcatacgggaagaagtgtgcactttgatctgacccaagtacggcaccctacaatt  
cgttaagccgaggttgaacactggcagagcattacgctgacttgcaggacggcggtttgtgaataaatgaactttgtgagttgaaggatc  
agatcacgcatctgaagttcctattccgaagttcctattctctagaagtataggaaacttgcattcatttaagtagaattttataaaagtgggtaattg  
agtaggttt

FIG.3 (ID. DE SEC. N°:2)

Fragmento de DNA que codifica la proteína de fusión de  
IgG M2 de conejo - péptido autoescindible F2A- bcl2 humano  
FRT rpsL-neo FRT.

5

```

1  GGTACCTGAA ACACACCATC GCTCCCGACT ACAGGAACAT GATCGGGCAG GGGGCCGTGA
61  AACAGACTTT GAATTTTGAC CTCTCTCAAGT TGGCGGGAGA CGTGGAGTCC AACCCAGGGC
121  CCATGGCCCA CGCCGGGCGC ACTGGCTATG ATAATCGCGA AATTGTCATG AGGTATATTG
181  ACTACAAGCT CTCTCAAAGA GGATACGAGT GGGATGCGGG GGACGTCGGC GCTGCCCCAC
241  CTGGAGCTGC GCGGCTCCA GGCATCTTTA GCAGCCAGCC GGGCCACACA CCTCACACCG
301  CTGCTCCAG GGATCCGGTG GCACGGACCA GCGCTCTGCA AACTCCCGCC GCCCCTGGGG
361  CTGCAGCGGG TCCCGCCTTG TCCCGGTGCG CCCCTGTGGT GCACCTCAGC CTGCGGCAGG
421  CGGGCGACGA CTTAGCAGG CGCTACAGAA GAGACTTTGC CGAAATGTCC CGCCAGCTCC
481  ATCTGACCCC CTTACCGCA CGAGGGAGGT TCGCCACCGT GGTGGAAGAA CTTTTCCGCG
541  ACGGTGTGAA CTGGGGCCGC ATCGTTGCC TTTTGTAGTT CGGGGGGGTT ATGTGCGTGG
601  AATCAGTGAA CCGCGAAATG AGTCCCTTGG TCGACAACAT AGCTCTTTGG ATGACAGAGT
661  ACCTGAACCG GCATCTGCAT ACTTGGATAC AGGACAACGG AGGATGGGAT GCTTTTGTGG
721  AGCTGTACGG CCCATCAATG CGCCCTTGT TCGACTTCAG CTGGTTGTCC CTGAAGACGC
781  TCCTGAGCCT CGCTCTGTG GCGCCTGTA TCACPTTGG CGCCTATCTC GGACATAAAT
841  AAGAGTTTCC TATTCCGAAG TTCTATTCT TCAAAAGGTA TAGGAACCTC GAATTCATTA
901  CAAGTTGCGA AAAGCAACGT GCCTGCGCTG TAATGTCAAT TTCAAACCGT CCACCCATCA
961  GGCCTGGTGA TGATGGCGGG ATCGTTGTAT ATTCTTTGAC ACCTTTTCGG CATCGCCCTA
1021  AAATTCGGCG TCCTCATATT GTGTGAGGAC GTTTTATTAC GTGTTTACGA AGCAAAAGCT
1081  AARCCAGGA GCTATTTAAT GGCACAGTT AACCAGCTGG TACGCAAAAC ACGTGCTCGC
1141  AAAGTTGCGA AAAGCAACGT GCCTGCGCTG GAAGCATGCC CGCAAAACG TGGCGTATGT
1201  ACTCGTGTAT ATACTACCAC TCCTAAAAA CCGAACTCCG CGCTGCGTAA AGTATGCCGT
1261  GTTCGTCTGA CTAACGGTTT CGAAGTGACT TCCTACATCG GTGGTGAAGG TCACAACCTG
1321  CAGGAGCACT CCGTGATCCT GATCCGTGGC GGTGCTGTTA AAGACCTCCC GGGTGTTCGT
1381  TACCACACCG TACGTGGTGC GCTTGAATGC TCCGGCGTTA AAGACCGTAA GCAGGCTCGT
1441  TCCAAGTATG GCGTGAAGCG TCCTAAGGCT TAAGGAGGAC AATCATGATT GAACAAGATG
1501  GATTGCACGC AGGTTCTCCG GCCGCTTGGG TGGAGAGGCT ATTGCGCTAT GACTGGGCAC
1561  AACAGACAAT CGGCTGCTCT GATGCCGCCG TGTCCGGCTG GTCAGCGCAG GGGCGCCCGG
1621  TTCITTTTGT CAAGACCGAC CTGTCCGCTG CCTGAATGA ACTGCAGGAC GAGGCAGCGC
1681  GCGTATCGTG GCTGGCCACG ACGGGCGTTC CTTGCGCAGC TGTGCTCGAC GTTGTCACTG
1741  AAGCGGGAAG GGACTGGCTG CTATGGGCG AAGTGCCCGG GCAGGATCTC CTGTCTCTC
1801  ACCTTGCTCC TGCGAGAAA GTATCCATCA TGGCTGATGC AATGCGGCGG CTGCATAAGC
1861  TTGATCCGGC TACCTGCCCA TTGACCCACC AAGCGAAACA TCGCATCGAG CGAGCACGTA
1921  CTCGGATGGA AGCCGGTCTT GTCGATCAGG ATGATCTGGA CGAAGAGCAT CAGGGGCTCG
1981  CGCCAGCCGA ACTGTTCCGC AGGCTCAAGG CGCGCATGCC CGACGGCGAG GATCTCGTGG
2041  TGACCCATGG CGATGCCTGC TTGCCGAATA TCATGCTGGA AAATGGCCGC TTTTCTGAT
2101  TCATCGACTG TGGCCGGCTG GGTGTGGCGG ACCGCTATCA GGACATAGCG TTGGCTACCC
2161  GTGATATTGC TGAAGAGCTT GCGGCGAAT GGGCTGACCG CTTCTCGTG CTTTACGTA
2221  TGGCCGCTCC CGATTGCGAG CGCATCGCTT TCTATCGCTT TCTTGACGAG TTCTTCTGAG
2281  AAGTTCCTAT TCGAAGTTC CTATTCTTCA AAAGGTATAG GAACITCGCC CTTGCTCTC
2341  ACAGCTGCC TCCCTGGCCA GCAGGAGCCC CCGCTCTCTC GAG

```



FIG.4 (ID. DE SEC. N°:3)

rpsL-neo flanqueada con sitios FRT y FRT2.

```

1 CGTCCATTCC CAACACATGA ACAGCATCTC ACGCCACCTC TGTTGCCTGC GAAGTTCCTA
61 TTCGGAAGTT CCTATTCTCT ACTTAGTATA GGAAC TTCAT TACACCAGTG TCAGTAAGCG
121 GGCAAGTCG GTTAATGTCA GTTTCAAAAC GTCCACCCAT CAGGCCCTGGT GATGATGGCG
181 GGATCGTTGT ATATTTCTTG ACACCTTTTC GGCATCGCCC TAAAATTCGG CGTCCTCATA
241 TTGTGTGAGG ACGTTTTATT ACGTGTTTAC GAAGCAAAAG CTAACCAG GAGCTATTTA
301 ATGGCAACAG TTAACCAAGT GGTACGCAAA CCACGTGCTC GCAAAGTTGC GAAAAGCAAC
361 GTGCCCTGCG TGGAAGCATG CCCGCAAAAA CGTGGCGTAT GTACTCGTGT ATATACTACC
421 ACTCCTAAAA AACCGAACTC CGCGCTGCGT AAAGTATGCC GTGTTCGTCT GACTAACGGT
481 TTCGAAGTGA CTTCCTACAT CGGTGGTGAA GGTCAACAAC TGCAGGAGCA CTCCTGTATC
541 CTGATCCGTG GCGGTCTGTG TAAAGACCTC CCGGGTGTTC GTTACCACAC CGTACGTGGT
601 GCGCTTGACT GCTCCGGCGT TAAAGACCGT AAGCAGGCTC GTTCCAAGTA TGGCGTGAAG
661 CGTCCTAAGG CTTAAGGAGG ACAATCATGA TTGAACAAGA TGGATTGCAC GCAGGTTCTC
721 CGGCCGCTTG GGTGGAGAGG CTATTGCGCT ATGACTGGGC ACAACAGACA ATCGGCTGCT
781 CTGATGCCGC CGTGTTCGGG CTGTCAGCGC AGGGGCGCCC GGTTCCTTTT GTCAAGACCG
841 ACCTGTCCGG TGCCCTGAAT GAACTGCAGG ACGAGGCAGC GCGGCTATCG TGGCTGGCCA
901 CGACGGCGCT TCCTTGCGCA GCTGTGCTCG ACGTGTCTAC TGAAGCGGGA AGGGACTGGC
961 TGCTATTGGG CGAAGTGCCG GGGCAGGATC TCCTGTCTATC TCACCTTGCT CCTGCCGAGA
1021 AAGTATCCAT CATGGCTGAT GCAATGCGGC GGCTGCATAC GCTTGATCCG GCTACCTGCC
1081 CATTGACCA CCAAGCGAAA CATCGCATCG AGCGAGCAGC TACTCGGATG GAAGCCGGTC
1141 TTGTGATCA GGATGATCTG GACGAAGAGC ATCAGGGGCT CCGGCCAGCC GAACTGTTCG
1201 CCAGGCTCAA GCGCGCATG CCCGACGGCG AGGATCTCGT CGTGACCCAT GGCATGCCCT
1261 GCTTGCCGAA TATCATGGTG GAAAATGGCC GCTTTTCTGG ATTTCATGAC TGTGGCCGGC
1321 TGGGTGTGGC GGACCGCTAT CAGGACATAG CGTTGGCTAC CCGTGATATT GCTGAAGAGC
1381 TTGGCGGCGA ATGGGCTGAC CGCTTCCTCG TGCTTTACGG TATCGCGCTC CCCGATTCCG
1441 AGCGCATCGC CTTCTATCGC CTTCTTGACG AGTTCCTCTG AGAAGTTCCT ATTCGGAAGT
1501 TCCTATTCTC TAGAAAGTAT AGGAACTTCC CTGAGAAGGA TGTCGGAGGC CAAGAGACAA
1561 GCCCGCCGTG GCCCTGCTC

```

FIG.5 (ID. DE SEC. N°:4)

- 5 Fragmento de DNA que codifica la proteína de fusión con IgG M2 de conejo - péptido autoescindible F2A - bcl2 humano con codones optimizados flanqueada por sitios FRT y FRT2.

```

1 GAATTCGAAG TTCTATTCC GAAGTTCCTA TTCTTACTT AGTATAGGAA CTTGAGGTGA
61 AGCAGACTTT GATTTTGGAC CTTCTCAAGT TGGCGGGAGA CGTGGAGTCC AATCCAGGGC
121 CCATGGCCCA CGCCGGGCGC ACTGGCTATG ATAATCGCGA AATGTGCATG AAGTATATTC
181 ACTACAAGCT CTCTCAAAGA GGATACGAGT GGGATGCGGG GGACGTCCGC GCAGCTCCAC
241 CTGGAGCTGC GCGGGCCCTT GGCATCTTTA GCAGCCAGCC GGGCCACACA CCTCACACCG
301 CTGCCCTCCAG GGATCCGCTG GCACGGACCA GCCCTCTGCA AACTCCCGCC GCCCTGGGG
361 CTGCAGCGGG TCCCGCCTTG TCCCGGCTGC CCCCTGTGGT GCACCTCAGC CTGCGGCAGG
421 CGGGCGACGA CTTGAGCAGG CGCTACAGAA GAGACTTTGC CGAAATGTCC CGCCAGCTCC
481 ATCTGACCCC CTTACCCGCA CGAGGGAGGT TCGCCACCGT GGTGGAAGAA CTTTTCCGCG
541 ACGGTGTGAA CTGGGGCCGC ATCGTTGCCT TTTTGTAGTT CGGGGGGGTT ATGTGCGTGG
601 AATCAGTGAA CCGCGAAATG AGTCCCTTGG TCGACAACAT AGCTCTTTGG ATGACAGAGT
661 ACCTGAACCG GCATCTGCAT ACTTGGATAC AGGACAACGG AGGATGGGAT GCTTTGTGTTG
721 AGCTGTACGG CCCATCAATG CGCCCTTGTG TCGACTTCAG CTGTTGTGTC CTGAAGACCG
781 TCCTGAGCCT CGCTTTGTG GCGCGCTGTA TCACTTTGGG CGCTATCTC GGACATAAAT
841 AAGAAGTTCC TATTCCGAAG TTCTATTCTC CTAGAAAGTA TAGGAACTTC CTCGAGGAAT
901 TC

```

FIG.6 (ID. DE SEC. N°:5)

MAHAGRTGYDNREIVMKYIHYKLSQRGYEWDAAGDAGAASAPGVFSSQPAPAAPRDPAARTSP  
PPPPAAAGPALSPVPPFVVHLTLRQAGDDFSRRYRRDFAEMSSQLHLTPFTARGRFATVVEEL  
FRDGVNWGRIVAFFEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWMTEYLNRLHHTWIQDNGGWDAFV  
ELYGPSVRFLSDFSWVSLKTLFSLALIGACITLGAYLGHK\*

FIG.7 (ID. DE SEC. N°:6)

Fragmento de DNA que codifica la proteína de fusión con  
5 IgG M2 de conejo - péptido autoescindible F2A - bcl2 humano  
con codones optimizados.

aggtgaagcagactttgaattttgaccttctcaagttggcgggagacgtggagtccaaccca  
ggggcccatggccacgcggggcgcaactggctatgataatecgcgaaatttgtcatgaagtatat  
tcactacaagctctctcaaagaggatacgagtgggatgcgggggacgtcggcgagctccac  
ctggagctgcgcgggcccctggcatcttagcagccagccggggccacacacctcacaccgct  
gectccagggatccggtggcacggaccagccctctgcaaactcccgcggccctggggctgc  
agcgggtcccgccttgtccccgggtgccccctgtggtgcacctcacgctgcggcaggcgggcg  
acgacttcagcaggcgctacagaagagactttgccgaaatgtcccgcagctccatctgacc  
cccttcaccgcacgaggggaggttcgccaccgtggtcgaagaacttttcggogacgggtgtgaa  
ctggggcgcgcatcgttgcttttttgagttcgggggggttatgtgcgtggaatcagtgaaac  
gcgaaatgagtccttggtcgacaacatagctcttggatgacagagtacctgaaccggcat  
ctgcatacttggtacaggacaacggaggatgggatgcttttggtgagctgtaaggcccatc  
aatgcgccccttggtcgacttcagctgggtgtccctgaagaagctcctgagcctcgctcttg  
tgggcgcctgtatcactttgggcgcctatctoggacataaataa

- 92 -

FIG.8 (ID. DE SEC. N°:7)

Fragmento de DNA que codifica la proteína de fusión con  
IgM M2 de conejo - péptido autoescindible F2A - bcl2 humano.

```

aggtgaagcagaactttgaattttgaccttctcaagttggcgggagacgtggagtgccaaccca
gggcccattggcgacgctgggagaaacagggtacgataaaccgggagatagtgatgaagtacat
ccattataagctgtcgagaggggctacgagtgggatgcgggagatgtgggcgcgcgcgcgcgc
cgggggcgcccccgcgccgggcatcttctcctcgagcccgggcacacgccccatacagcc
gcatcccgggaccgggtcgccaggacctcgccgctgcagaccccggtgccccggcgcgcg
cgcggggctgcgctcagcccggtgccacctgtgggtccacctgacctccgcccaggccggcg
acgacttctcccgccgctaccgcccgcgacttcgcccagatgtccaggcagctgcacctgacg
cccttcaccgcgcggggacgctttgcccacgggtggaggagctcttcagggacgggggtgaa
ctgggggaggattgtggccttctttgagttcggtgggggtcatgtgtgtggagagcgtcaacc
gggagatgtcgccctggtggacaacatcgccctgtggatgactgagtaacctgaaccggcac
ctgcacacctggatccaggataaocggaggctgggatgcctttgtggaaactgtacggccccag
catgcggcctctgtttgatttctcctggctgtctctgaagactctgctcagtttggccctgg
tgggagcttgcatcaccctgggtgcctatctggggccacaagtga

```

5 FIG.9 (ID. DE SEC. N°:8)

Fragmento de DNA que codifica la proteína de fusión con  
IgG M2 de conejo - péptido autoescindible F2A - bcl2 humano  
con codones optimizados.

```

Aggtgaagtggatcttctcgctccgtgggtggagctgaaacacaccatcgctcccgactacagg
aacatgatcgggcagggggcggtgaaacagaactttgaattttgaccttctcaagttggcggg
agacgtggagtgccaacccagggcccatggcccacgcccgggcgcactggctatgataatcgcg
aaattgtcatgaagtatattcactacaagctctctcaaagaggatacagagtgggatgcgggg
gaogtggcgctgccccacctggagctgcgcgggctccaggcatctttagcagccagccggg
ccacacacctcacacogctgcctccagggatccgggtggcacggaccagccctctgcaaaactc
ccgcccgccttgggggtgcagcggtcccgccttgtccccgggtgccccctgtgggtgcacctc
acgctgcggcagggcgggcgacgaacttcagcaggcgctacagaagagactttgcccgaatgtc
ccgccagctccatctgaccccttcacgcacaggggaggttcgccacogtgggtcgaagaac
ttttccgcgaoggtgtgaactggggccgcacogtggccttttttgagttcggggggggttatg
tgcggtggaatcagtgaaocgcgaaatgagtcoccttgggtcgacaacatagotcttggatgac
agagtacctgaacoggcacatctgcatacttgatacaggacaacggaggatgggatgcttttg
ttgagctgtacggcccatcaatgcgccccttggttcgacttcagctgggttgccctgaagaog
ctcctgagcctcgctcttgtgggcgcctgtatcactttggggcgccatctcggacataaata
a

```



FIG.10 (ID. DE SEC. N°:9)

Fragmento de DNA que codifica la proteína de fusión con IgM M2 de conejo - diana de escisión de la furina - péptido autoescindible F2A - bcl2 humano.

5

```

aggtgaagcgagcaaagcgaccgggtgaaacagactttgaattttgaccttctcaagttggcg
ggagacgtggagtcgaacccaggggcccatggcgacgctgggagaacaggggtacgataacog
ggagatagtgatgaagtacatccattataagctgtcgagaggggctacgagtgggatgcgg
gagatgtgggogccgogccccggggggccgccccgogcggggcatcttctcctcgagccc
gggcacacgccccatacagccgcatccggggaccgggtcgccaggacctcgccgctgcagac
cccggctgccccggcgogcogcgggggcoctgogctcagcccggtgccacctgtggtccacc
tgacctccgcccaggccggcgacgacttctcccgccgctacogccgagacttogccgagatg
tccaggcagctgcacctgacgoccttcaccgogcggggagcgtttgccacgggtggaggagga
gctcttcagggacgggggtgaactgggggaggattgtggccttctttgagttcggtgggggtca
tgtgtgtggagagcgtcaaccgggagatgtcgccctggtggacaacatcgccctgtggatg
actgagtacctgaaccggcacctgcacacctggatccaggataacggaggctgggatgcctt
tgtggaactgtacggccccagcatgcggcctctgtttgatttctcctggctgtctctgaaga
ctctgctcagtttggccctggtgggagcttgcacaccctgggtgcctatctgggcccacaag
tga

```

FIG 11 (ID. DE SEC. N°:10)

Fragmento de DNA que codifica la proteína de fusión con IgG M2 de conejo - diana de escisión de la furina - péptido autoescindible F2A - bcl2 humano con codones optimizados.

10

```

aggtgaagtggatcttctcgtccgtgggtggagctgaaacacaccatcgctcccgactacagg
aacatgatcggggcagggggcccgagcaaagcgaccgggtgaaacagactttgaattttgacct
tctcaagttggcgggagacgtggagtcgaacccaggggcccatggccacgcggggcgccactg
gctatgataatcgogaaattgtcatgaagtatttactacaagctctctcaaaggaggatag
gagtgggatgcgggggacgtcgggcgtgccccacctggagctgcgcgggtccaggcatctt
tagcagccagccggggccacacacctcacaccgctgcctccagggatccgggtggcacggacca
gccctctgcaaactccgcgcggccctggggctgcagcgggtccgccttgtccccgggtgccc
cctgtgggtgcacctcaogctgoggcaggcggggcgaogacttcagcaggcgctacagaagaga
ctttgccgaaatgtcccgccagctccatctgaccccccttcaccgcacgaggggaggttogcca
ccgtggtcgaagaacttttccgcgacgggtgtgaactggggccgcacatogttgccttttttgag
ttcggggggggttatgtgogtggaatcagtgaaaccgcgaaatgagtccttgggtcgacaacat
agctctttggatgacagagtacctgaaccggcatctgcatacttggatacaggacaacggag
gatgggatgcttttgttgagctgtacggcccatcaatgcgcccttgttcgacttcagctgg
ttgtccctgaagaogctcctgagcctcgctcttgtgggcgcctgtatcactttggggcgcta
tctoggacataaataa

```