



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

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

⑯ Int. Cl.:

C07K 14/82 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **06789294 .3**

⑯ Fecha de presentación : **02.08.2006**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1910418**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2008**

④ Título: **Supresión de la apoptosis en linfocitos B en animales transgénicos que expresan inmunoglobulina humanizada.**

⑩ Prioridad: **03.08.2005 US 705305 P**

⑦ Titular/es:

TERAPEUTIC HUMAN POLYCLONALS, Inc.
3431 Hillview Avenue
Palo Alto, California 94304, US

④ Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.11.2010

⑦ Inventor/es: **Platzer, Josef y
Buelow, Roland**

④ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.11.2010

⑦ 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 químéricos 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 5 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 10 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, 15 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 20 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 25 (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 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 15 las células madre embrionarias se describe en la patente Estadounidense N° 5.453.357.

20

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 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):475-784 (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).

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 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).

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 químérica 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 epítopos. 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.

15 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) 15 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 5 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 10 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 15 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 20 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 25 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 25 anticuerpos mediante la reordenación génica temprana al 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 10 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 15 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 20 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 25 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 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 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 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^a ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994), y March, *Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure* 4^a 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 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 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 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 genico o segmento del mismo de Ig humana, formas degeneradas de secuencias naturales de un locus genico 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 realization 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" 5 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 10 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 15 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 20 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 25 (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 5 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, 10 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 15 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 20 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 25 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 5 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 10 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.

15 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 20 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 25 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 antigenicas 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 naïve. 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 apoptosis, 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 5 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 10 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 15 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 inmunoespecífico, preferiblemente un promotor específico de linfocito B. Por lo tanto, se aumenta 20 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 25 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 5 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 10 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 15 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, 20 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 químicos descritos anteriormente comprenden secuencias de DNA que codifican un péptido 25 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 5 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 10 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-, 15 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 20 insecto del asigma 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 25 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 asigma de Thosea (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 químéricos. 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 5 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 10 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 15 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 20 (humanizados) contiene(n) un locus de Ig o un 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 25 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: κ y γ . Los genes de la cadena ligera κ humana se encuentran en el cromosoma 2 y los genes de la cadena ligera γ 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 κ , 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 genético 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, 5 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 10 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 15 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 20 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, 25 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 5 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 10 nucleicos 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 15 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 20 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 25 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 5 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 10 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 15 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, 20 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 hidrofilicidad. La patente estadounidense N° 25 4.554.101 muestra que la mayor hidrofilicidad promedia local de una proteína, que viene dada por la hidrofilicidad 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 hidrofilicidad 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 hidrofilicidad similar y seguir obteniendo una proteína equivalente biológicamente y equivalente inmunológicamente. En tales cambios, es preferible la substitución de aminoácidos cuyos valores de 15 hidrofilicidad 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 sustituciones de aminoácidos 20 generalmente se basan en la similitud relativa de los sustituyentes de las cadenas laterales de los aminoácidos, por ejemplo, de su hidrofobicidad, hidrofilicidad, carga, tamaño y similares. Los ejemplos de sustituciones 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 5 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 10 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 15 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 20 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 25 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 10¹² posible estructuras de unión. En todos

los animales, lo que incluye los humanos, el proceso de generación de anticuerpos se inicia recombinando segmentos variables (V), de diversidad (D) y de unión (J) del locus de las inmunoglobulinas (Ig). Tras este paso, dependiendo de la 5 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 10 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 genico, es decir, 15 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 20 genico 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 genico para formar un 25 segmento VDJ contiguo. En los pollos, sólo se utilizan un segmento genico V (el que está adyacente a la región D o "segmento genico 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 5 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 10 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 15 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 20 constantes de la cadena pesada que comprenden el dominio Fc. Los dominios F(ab) de los anticuerpos se unen a secuencias específicas (epítopos) en los antígenos, mientras el dominio Fc de los anticuerpos recluta y activa otros componentes del sistema inmune para eliminar los antígenos.

25 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^a 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 10 anticuerpos sustancialmente mediante conversión génica y/o 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 15 ejemplo conejos, aves, ovejas, cabras, vacas, cerdos, 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 esperma 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 homozigota 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 5 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 10 generar los animales transgénicos. Alternativamente, las células modificadas genéticamente seleccionadas pueden inyectarse en embriones en desarrollo que se desarrollan subsiguentemente en animales quiméricos.

Además, de acuerdo con la presente invención, también 15 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 20 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 25 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 5 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 10 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 15 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.

20 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 25 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 isótipos. Alternativamente, la preparación de anticuerpo puede contener anticuerpos de sólo un isótipo, o un número de isótipos seleccionados.

15 Para obtener un anticuerpo monoclonal humano (humanizado) se aislan 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 clonian 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 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 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 agentes químicos o enzimas. Alternativamente, la fracción de inmunoglobulinas puede someterse a un tratamiento como una digestión enzimática (por ejemplo con pepsina, papaína, plasmina, glucosidases, nucleasas, etc.), calentamiento, etc. y/o un posterior fraccionamiento.

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 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 25 de inhibidores de la apoptosis, péptidos autoescindibles o 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° 15 acceso de Gene Bank: AY495827, y AY495828, respectivamente) que contienen los segmentos 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 20 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 25 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 fósmido Fos15B se secuenciaron (Nº acceso del 25 Genebank 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); Muyrers 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 μ 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/β. 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 5 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 15 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 20 (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

<110> BUELOW, Roland
 PLATZER, Josef
 <120> Supresión de la apoptosis de los linfocitos B en
 5 animales transgénicos que expresan inmunoglobulinas
 humanizadas
 <130> 39691-0014A US
 <140> Pendiente de asignación
 <147> 2006-07-28
 10 <150> US 60/705,305
 <151> 2005-08-03
 <160> 20
 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
 <210> 1
 15 <211> 2338
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 20 <400> 1
 acataaaatat actgtcttcc aggatcttag agctcaccta agggaaacaag agttcattt 60
 aagtttttaa agtgaacctc agtgactttg ggatgtgaac tctccgagta gaagcatgcg 120
 cactgcaggt aaaccttgtc agccctggtc tgagctgggg cagctggaga cacagccct 180
 gggctgagtt ctgagctgcc ctggggccctt cagctggca cagccctgcc ccggccctgc 240
 tcatttgcatt gtccccagag caccacccac ctctctgggc atttaggagc aggttgctcc 300
 cgccccatgc aggaggcagt gccaggcagg acccagcatg ggcgcacgcgt ggagaacagg 360
 gtacgataaac cgggagatag ttagtgaagta catccattat aagctgtcgc agaggggcta 420
 Cgaggatggat gccccggatg tgccgcggcc gccccccgggg gccgcggcccg cgcggggcat 480
 ctttccttcg cagcccccgc acacgccccca tacagccgca tcccccgggacc cggtcgcccag 540
 gacccgcggc ctgcagaccc cggctgcccc cggcgcggcc gccccggccctg cgctcagccc 600
 ggtgccacct gtgggtccacc tgacccctccg ccaggccggc gacgactttt cccgcgccta 660
 ccgcgcgcac ttccgcggaga tgccaggca gctgcacctg acgccttca cccgcgcgggg 720
 acgtttgcc acgggtgggg aggagctttt caggacgggg gtgaactggg ggaggattgt 780
 ggccttcattt gagttccggtg gggatcatgtg tggggagagc gtcaaccggg agatgtcgc 840
 cctgggtggac aacatcgccc tggatgac tgatgtacctg aaccggcacc tgacacacctg 900
 gatccaggat aacggaggct gggatgcctt tggatgactg tacggcccca gcatgcggcc 960
 tctgtttgat ttctccctggc tggatgtcactg gactctgtc agtttggccccc tggatggggagc 1020

ttgcatcacc	ctgggtgcct	atctggcca	caagtgaatc	ttttccctc	tgcacaaaaat	1080
tatggggaca	tcatgaagcc	ccttgcacat	ctgacttctg	gctaataaaag	gaatattatt	1140
ttcattgcaa	tagtgtgtt	gaatttttg	tgtctctac	tcggaaggac	atatgggagg	1200
gcaaattcatt	taaaacatca	gaatgagtat	ttggtttaga	gtttggcaac	atatgccgaa	1260
gttccttattc	cgaagttcct	atttctctaga	aagtataagga	actttctggag	ttttagatcc	1320
tctacggccgg	acgcacatcg	gccggcatca	ccggctgaaag	gcacgaaaccc	atgttgacata	1380
agccctgttcg	gttgcgtaaac	tgtaatgcaa	gtagcgatg	cgctcgcgca	actgggttccag	1440
aaccttgcacc	gaacgcgcg	gtggtaacgg	cgcagtggcg	gttttcatgg	cttgcgttatga	1500
ctgttttttt	gtacagtct	tgccctggc	atccaaagcg	caaggcgcgtt	acggcgtggg	1560
tcgatgtttt	atgttatgga	gcagcaacga	tgttacgcag	cagcaacat	gttacgcagc	1620
agggcagtgc	ccctaaaaca	aagtttaggt	gctcaagtat	gggcacatcatt	cgcacatgtta	1680
ggctcgcccc	tgaccaagtc	aaatccatgc	gggctgctct	tgatcttttc	ggtcgtgagtt	1740
tcggagacgt	agccacctac	tcccaacatc	agccggactc	cgattaccc	ggaaacttgc	1800
tccgttagtaa	gacattcattc	gcgcgttgc	ccttcgacca	agaaggcggtt	gttggcgctc	1860
tcgcggctta	cgttctgc	aggttttaggc	agccgcgtag	tgagatcttat	atctatgatc	1920
tcgcagtc	cggcgagcac	cggaggcagg	gcattggccac	cgcgcctatc	aaatccctca	1980
agcatgggc	caacgcgtt	ggtgcattatg	tgtatctacgt	gcaaggcagat	tacggtgacg	2040
atccccggat	ggctcttat	acaaaggtag	gcatacggga	agaagtgtatg	cactttgata	2100
tcgacccaag	taccgcacc	taacaattcg	ttcaagccga	ggttgtaaaca	cttgcagagc	2160
attacgctga	cttgacggga	cggcggttt	gttgaataaa	tcgaactttt	gctgagttga	2220
aggatcagat	cacgcacat	gaagttccct	ttcccgaaat	cctattctct	agaaaagtata	2280
ggaacttcga	tttacttttta	agttagaaatt	ttataaaaagt	gggttaatq	gttaggtttt	2338

aggatcagat cacgcacatgg aaggtttccata ttcccgaaatgtt cctattctct agaaaagtata 2280
ggaaacttcga ttcaacttttta agtagaaaatt ttataaaaatgtt gggttaaatgtt gttaggttt 2338

<210> 2

<211> 2383

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

<400> 2

ggtagtggaa	acacaccatc	gtccccact	acaggAACat	gatcgggcag	ggggccgtga	60
aacagacttt	gaattttgac	cttctcaagt	tggcgggaga	cgtggagtcc	aaccCaggc	120
ccatggggca	cggcgggcgc	actggctatg	ataatgcgcg	aattgtcatg	aagtatattc	180
actacaagct	ctctcaaaga	ggatacgggt	gggatgcggg	ggacgtcgcc	gctgccccac	240
ctggaggtgc	ggcggtccca	ggcatacttta	gcagccagcc	ggggcacaca	cctcacaccg	300
ctgccttcag	ggatccccgtt	gcacggacca	gccctctgca	aactcccggc	gccccctgggg	360
ctgcagcggg	tcccggcttg	tccccgtgc	ccccctgtgt	gcacccatcg	ctgcggcagg	420
cgggcgacga	cttcagcagg	cgctacagaa	gagactttgc	cgaaatgtcc	cgccagtc	480
atctgacccc	cttcaccgca	cgagggaggt	tcggccacccgt	gtcgaagaa	cttttcccg	540
acggtgtgaa	ctggggccgc	atcggtgcct	tttttgagggt	cggggggggtt	atgtgcgtgg	600
aatcagtgaa	ccgcgaaatg	atgtcccttgg	tcgacaacat	agctctttgg	atgacagagt	660
acctgaaccg	gcatactgcat	acttggatac	aggacaaacgg	aggatgggat	gcttttgttg	720
agctgtacgg	cccatcaatg	cgccccctgt	tcgactttcag	ctgggttgtcc	ctgaagacgc	780
tcctgagcct	cgctcttgg	ggcgcctgtt	tcactttggg	cgccatatctc	ggacataataat	840
aagaagttcc	tattccgaaag	ttccttattct	tcaaaaaggta	taggaacttc	gaatttcatta	900
caccagtgtc	agtaaggcggg	caaagtgggt	taatgtcagt	ttccaaaacgt	ccacccatca	960
ggctgtgtga	tgtatggcggg	atcggtgtat	atttcttgcac	accttttccgg	catcgcccta	1020
aaattccggcg	tccctatatt	gtgtggagac	gttttattac	gtgtttacga	acggaaaagct	1080
aaaaccagga	gctattttat	ggcaacagtt	aaccagtcgg	tacgcaaacc	acgtgctcgc	1140
aaagttgcga	aaagcaacgt	gcctgcgtcg	gaagcatgcc	cgaaaaaaacg	tggcgtatgt	1200
actcggttat	atactaccac	tcctaaaaaa	ccgaactccg	cgctgcgtaa	agtatgccgt	1260
gttcgtctga	ctaaccgggtt	cgaagtgact	tcctacatcg	gtggtgaagg	tcacaacctg	1320

caggāgcaāt ccgtgātccct gātccgtggc ggtcggttā āāgācctcc̄ ggggttctḡ 1380
 taccacaccg tacgtgggtgc gcttgactgc tccggcgttā aagaccgtaa gcaggctcḡ 1440
 tccaagtatg gcgtaagcg tcctaaggct taaggaggac aatcatgatt gaacaagatg 1500
 gattgcacgc aggttcccg gcccgttggg tggagaggct attcggttat gactggcac 1560
 aacagacaat cggctgtct gatgcccggc tggccggct gtcagcgcag gggcccccgg 1620
 ttcttttgc̄ caagaccgac ctgtccgggtg cccgtaatga actgcaggac gaggcagcgc 1680
 ggctatcḡ gctggccacg acggggcgttc cttgcgcagc tggctcgac gttgtactg 1740
 aagcgggaag ggactggctg ctattggcg aagtgcggg gcaggatctc ctgtcatctc 1800
 accttgcctc tgccgagaaa gatatccatca tggctgtatgc aatgcggcg gtcgcatacg 1860
 ttgatccggc tacctggcca ttgcgaccacc aagcggaaaca tcgcattcgag cgagcacgt 1920
 ctggatggc agccggctt gtcgatcagg atgatctgg acaagagatc caggggctcg 1980
 cggcagcggc actgttgcg acgctcaagg cgccatcgcc cgacggcgag gatctcg 2040
 tgaccatgg cgatgcctgc ttgcccataa tcatgggtgg aatggccgc ttttctggat 2100
 tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcg accgcttatca ggacatagcg ttggctaccc 2160
 gtgatattgc tgaagagctt ggccggcgaat gggctgaccg cttccctcgat ctttacggta 2220
 tcgcccgtcc cgattcgcag cgcatcgccct tctatcgccct ttttgcagcg ttcttctgag 2280
 aagttccat tccgaagttc ctattcttca aaaggatata gaaacttcgac cttcggttctc 2340
 acagecctgccc tccctggcca gcaggagccc cccgcctccctc gag 2383

<210> 3

<211> 1579

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

<400> 3

cgtccattcc caacacatga acagcatctc acgccacctc tggccctgc gaagttccct 60
 ttccgaagtt cctattctct acttagtata ggaacttcat tacaccagt tacgtaaagcg 120
 ggcaaaagtgc gttaatgtca gtttcaaaaac gtccacccat caggccctgtt gatgtggg 180
 ggtatcggtt atatttcttgc acacctttc ggcatcgccc taaaatttcgg cgtccctata 240
 ttgtgtgagg acgttttatt acgtgtttac gaagcaaaaag cttaaaaccag gagctatttt 300
 atggcaacag ttaaccagct ggtacgcaaa ccacgtgctc gcaaagttgc gaaaagcaac 360

gtgcctgcgc tggaaagcatg cccgcaaaaa cgtggcgat gtaactcgat atataactacc 420
 actcctaaaaa aaccgaactc cgccgtcgat aaagtatgcc gtgttgcgtt gactaacgg 480
 ttcaagtgat cttccctacat cgggtgtgaa ggtcacaacc tgcaggagca ctccgtatc 540
 ctgatccgtg cgggtcgat taaagacacc cccgggtgtt gttaccacac cgtacgtgg 600
 ggccttgact gctccggcgt taaagaccgt aagcaggctc gttccaaagta tggcgtgaag 660
 cgtccctaagg cttaaaggagg acaatcatga ttgaaacaaga tggattgcac gcagggttctc 720
 cggccgcttg ggtggagagg ctattcgat atgactggc acaacagaca atccgctgt 780
 ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc agggcgccc gtttctttt gtcaagaccg 840
 acctgtccgg tggccctgaaat gaaactgcagg acgaggcagc gggctatcg tggctggcca 900
 cggccggcgt tccttgcgc gctgtgcgt acgttgcac tgaagcgggaa agggactggc 960
 tgcattttggg cgaagtgcgc gggcaggatc tccgtcattc tcaccttgc cctgcccaga 1020
 aagtatccat catggctgtat gcaatgcggc ggctgcatac gtttgcattc gtcacctg 1080
 cattegacca ccaaggcggaa categcatcg agcgaggcagc tactcgatg gaagccggc 1140
 ttgtcgatca ggatgatctg gacgaaagacg atcaggggct cgcgcaccc gaaactttcg 1200
 ccaggctcaa ggcgcgcgtccc gacggcgcg aggatctcgat cgtgaccat ggcgtatgc 1260
 gcttgcgaa tatcatggat gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgat tggccggc 1320
 tgggtgtggc ggaccgcgtat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc 1380
 ttggccggcga atgggctgac cgcttccctc tgctttacgg tattcgccgt cccgattcg 1440
 agcgcatcgat cttctatcgat cttcttgcac agtcttctg agaagttctt attccgaat 1500
 tcctattctc tagaaagtat aggaacttcc ctgagaaggat tgcggaggc caagagacaa 1560
 gcccggcgat gcccgtc 1579

- 71 -

<210> 4
 <211> 902
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 4

```

gaattcgaag ttcctattcc gaagttccctt ttcttactt agtataggaa cttcagggtga 60
agcagacttt gaattttgac cttctcaagt tggcgggaga cgtggagtcc aaccaggc 120
ccatggccca cggccggcgc actggctatg ataatcgca aattgtcatg aagtatattc 180
actacaagct ctctcaaaga ggatacgagt gggatgcggg ggacgtcggc gcagctccac 240
ctggagctgc gcccggccct gcatcttta gcagccagcc gggccacaca cttcacacccg 300
ctgcctccag ggatccggtg gcacggacca gcccctctgca aactcccgc gcccctgggg 360
ctgcagcggg tcccgccttgc tccccgggtgc cccctgtggt gcacctcacg ctgcggcagg 420
cgggcgacga cttcagcagg cgctacagaa gagactttgc cgaaatgtcc cgcagctcc 480
atctgacccc ttccacccgca cgagggaggt tcgcacccgt ggtcgaagaa cttttccgcg 540
acggtgtgaa ctggggccgc atcggtgcct tttttgagtt cgggggggggt atgtgcgtgg 600
aattcgtgaa cgcgaaatg agtcccttggt tcgacaacat agctctttgg atgacagagt 660
acctgaaccg gcatctgcatt acttggatac aggacaacgg agatgggat gctttgttg 720
agctgtacgg cccatcaatg cgcccccttgc tcgacttcag ctggttgtcc ctgaagacgc 780
tcctgagcct cgctcttgc ggcgcctgtt tcactttggg cgcctatctc ggacataaat 840
aagaagttcc tattccgaag ttccctattct ctagaaaagta taggaacttc ctcgaggaat 900
tc 902
  
```

<210> 5
 <211> 226
 10 <212> PRT
 <213> oryctolagus
 <400> 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

<210> 6

<211> 788

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

<400> 6

aggtgaagca gactttgaat tttgacccccc tcaagttggc gggagacgtg gagtccaaacc 60
 caggggccat ggccccacgccc gggcgactg gctatgataa tcgcggaaatt gtcatgaagt 120
 atattcaacta caagctctct caaagaggat acgagtggga tgcggggggac gtcggcgag 180
 ctccacacctgg agctgcgcgg gccccctggca tcttttagcag ccagccgggc cacacaccc 240
 acaccgcgtgc ctccagggat ccgggtggcac ggaccagccc tctgcaaaact cccggccccc 300
 ctggggctgc agcgggtccc gccttgtccc cgggtgcccccc tgggtgcac ctcacgcgtc 360
 ggcaggcgcc cgacgacttc agcaggcgct acagaagaga ctttccgaa atgtcccgcc 420
 agctccatct gacccccc tcc accgcacgag ggagggttcgc caccgtggtc gaagaacttt 480
 tccgcgacgg tggactgg ggccgcatacg ttgcctttt tgagttcggg ggggttatgt 540
 gcgttggaaatc agtgaaccgc gaaatgagtc ctttggtcga caacatagct ctttggatga 600
 cagagtacct gaaaccggcat ctgcataactt ggatacagga caacggagga tgggatgctt 660
 ttgttggagct gtacggccca tcaatgcgc ctttggtcga cttcagctgg ttgtccctga 720
 agacgcctccct gaggcctcgct cttgtggcg cctgtatcac tttggccgc tatctcggac 780
 ataaataaa 788

<210> 7

10 <211> 788

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

<400> 7

```

aggtgaagca gactttgaat tttgaccrrtc tcaagttggc gggagacgtg gagtccaaacc 60
cagggcccat ggcgcacgct gggagaacag ggtacgataa cccggagata gtatgaagt 120
acatccatTA taagctgtcg cagagggct acgagtggga tgcggagat gtgggcgcg 180
cgccccccggg ggccgcccccc gcgcgggca tcitctcctc gcagccccc cacacgcccc 240
atacagccgc atcccgggac cgggtcgcca ggacctcgcc gctgcagacc cccgctgccc 300
ccggcgcggc cgcggggcct ggcgtcagcc cgggtgccacc tgggtccac ctgaccctcc 360
gccaggccgg cgacgacttc tcccgccgct accgcccgcga cttcggcagatgtccaggc 420
agctgcacat gacgccttc accgcgcggg gacgccttgc cacgggtggg gaggagctt 480
tcagggacgg ggtgaactgg gggaggattt tggccttctt tgagttcggt ggggtcatgt 540
gtgtggagag cgtcaaccgg gagatgtcgc cccgtgtggaa caacatcgcc ctgtggatga 600
ctgagtagctt gaaccggcac ctgcacacactt ggatccagga taacggaggc tgggatgcct 660
ttgtggaaact gtacggccccc agcatgcggc ctctgtttga ttctctctgg ctgtctctga 720
agactctgtt cagtttggcc ctgggtggag cttgcattcac cctgggtgccc tatctggggcc 780
acaagtga 788

```

<210> 8

<211> 869

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética

<400> 8

```

aggtgaagtg gatcttctcg tccgtggtgg agctgaaaca caccatcgct cccgactaca 60
ggaacatgat cgggcagggg gccgtgaaac agactttgaa ttttgacctt ctcaagttgg 120
cgggagacgt ggagtccaaac ccaggccccca tggcccaacgc cgggcgcact ggctatgata 180
atcgcgaaat tgcgtcatgaag tatattcaact acaagcttc tcaaagagga tacgagtggg 240
atgcggggga cgtcggcgcgt gcccccacctg gagctgcgcg ggctccaggc atcttttagca 300
gccagccggg ccacacacactt cacacgcgtg cttccaggga tccgggtggca cggaccagcc 360
ctctgcaaaac tcccgccggc cctggggctg cagcgggtcc cgccttgc cccgtggcccc 420
ctgtggtgca ctcacgcgtg cggcaggcgg acitggccga aatgtcccgcc cagctccatc tgacccccc taccgcacga gggaggttcg 540
ccaccgtggt cgaagaactt ttccgcacgc gtgtgaactg gggccgcattt gttgcctttt 600
ttgagttcg gggggttatg tgcgtggat cagtgaaccg cggaaatgagt cccttggtcg 660
acaacatagc tctttggatg acagagtacc tgaaccggca tctgcataact tggatataagg 720
acaacggagg atgggatgtt tttgttgagc tgcgtggcc atcaatgcgc cccttggtcg 780
acttcagctg gttgtccctg aagacgcgtc tgagcctcgc tcttgggtggc gcctgtatca 840
cttggcgccttgcataaataaa 869

```

<210> 9

10 <211> 809

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintética

15 <400> 9

- 74 -

aggtgaagcg agcaaagcg ccggtaaaac agactttgaa ttttgacctt ctcagaattgg 60
 cgggagacgt ggagtccaaac ccaggcccc tggcgcacgc tggagaaca ggtacgata 120
 accgggagat agtgatgaag tacatccatt ataagctgtc gcagaggggc tacgatggg 180
 atgcgggaga tgtgggcgc gcccgggg ggggccggcc cgcggggc atcttctcct 240
 cgcagcccg gcacacgccc catacagccg catcccgga cccggtcgcc aggacctcgc 300
 cgctgcagac cccggctgcc cccggccgg ccgcggggcc tgcgtcagc cgggtgcac 360
 ctgtggtcca cctgaccctc cgccaggccg gcaacggactt ctccggccgc taccggccg 420
 acttcggcga gatgtccagg cagctgcacc tgacgccccctt caccggcggg ggacgctttg 480
 ccacgggttgtt ggaggagctc ttcaggagcg gggtgaactg ggggaggatt gtggccttct 540
 ttgagttcgg tgggtcatg tgtgtggaga gcgtcaaccc ggagatgtcg cccctggg 600
 acaacatcgc cctgtggatg actgagttacc tgaacccggca cctgcacacc tggatccagg 660
 ataacggagg ctgggatgcc tttggaaac tgtacggccc cagcatgcgg cctctgtttg 720
 atttctctgt gctgtctctg aagacitcgc tcagittggc cctgggtggga gcttgcatca 780
 ccctgggtgc ctatctgggc cacaagtga 809

<210> 10

<211> 884

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> secuencia sintética

<400> 10

aggtgaagtgc gatcttctcg tccgtgggtgg agctgaaaca caccatcgct cccgactaca 60
 ggaacatgat cgggcagggg gcccggacaa agcgaccgg gaaacagact ttgaattttg 120
 accttctcaa gttggcgggg gacgtggagt ccaaccagg gcccattggcc caccggggc 180
 gcactggcta tgataatcgc gaaattgtca tgaagtatata tcactacaag ctctctcaaa 240
 gaggatacga gtgggatgcg ggggacgtcg gcgtcgcccc acctggagct gcccggctc 300
 caggcatctt tagcagccag ccggccaca cacccacac cgctgcctcc agggatccgg 360
 tggcacggac cagccctctg caaactcccg ccgccccctgg ggctgcagcg ggtcccgct 420
 tggcccccgtt gccccctgtg gtgcaccc cgctgcggca ggcggggcagc gacttcagca 480
 ggcgtacag aagagacttt gccgaaatgt cccgccagct ccatctgacc cccttcaccg 540
 cacgaggagg gttcgccacc gtggtcgaag aactttccg cgacgggtgtg aactggggcc 600
 gcacgttgc ctttttttag ttcggggggg ttatgtgcgt ggaatcagtg aaccgcgaaaa 660
 tgagtccctt ggtcgacaac atagctttt ggatgacaga gtacctgaac cggcatctgc 720

atacttggat acaggacaac ggaggatggg atgcttttgt tgagctgtac ggcccatcaa 780
 tgccccccctt gttcgacttc agctgggtgt ccctgaagac gctcctgagc ctgcctttg 840
 tggcgccctg tatcaacttgc ggcgcctatc tcggacataaa ataa 884

<210> 11

<211> 239

10

<212> PRT

<213> Homo

<400> 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 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

<210> 12

<211> 199

<212> PRT

<213> Mus

5 <400> 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
 165 170 175
 Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn Gly Gly Trp
 180 185 190
 val Gly Ala Cys Leu Val Glu
 195

<210> 13

<211> 236

<212> PRT

<213> Mus

5 <400> 13

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 Thr 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
 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 Met Arg Pro Leu Phe Asp
 195 200 205
 Phe Ser Trp Leu Ser Leu Lys Thr 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

<210> 14

<211> 154

<212> PRT

<213> Rattus

10 <400> 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

<210> 15

<211> 235

<212> PRT

<213> Felis

5

<400> 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 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 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 -

<210> 16

<211> 236

<212> PRT

<213> Canis

5 <400> 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 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

<210> 17

<211> 229

<212> PRT

<213> Bos

10 <400> 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 Ala Ala Ala Gly Pro Ala Pro Ser Pro Val Pro
 65 70 75 80
 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 Phe Glu Phe Gly
 130 135 140
 Gly Val Met Cys Val Glu Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val
 145 150 155 160
 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

<210> 18

<211> 236

<212> PRT

<213> Cricetus

5 <220>

<221> Variante

<222> 215

<223> xaa = Cualquier aminoácido

<400> 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

<210> 19

<211> 233

<212> PRT

<213> Gallus

5 <400> 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 Pro Ala Pro Ala Ala Ala
 35 40 45
 Pro Ala Ala Val Ala Ala Ala Gly Ala Ser Ser His 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 Pro Gly Val His Leu Ala Leu Arg Gln Ala Gly Asp
 85 90 95
 Glu Phe Ser Arg 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 15 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, 20 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 25 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).

6. La construcción de expresión transgénica de la
5 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.

8. La construcción de expresión transgénica de la
reivindicación 5 en la que dicho fragmento de
15 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 (ERA V) y el virus asina 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.

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

15 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 tipo picornavirus y de la familia de rotavirus tipo C.

20 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 asigna de Thosea (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.

25 22. Un animal transgénico no humano sometido a 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

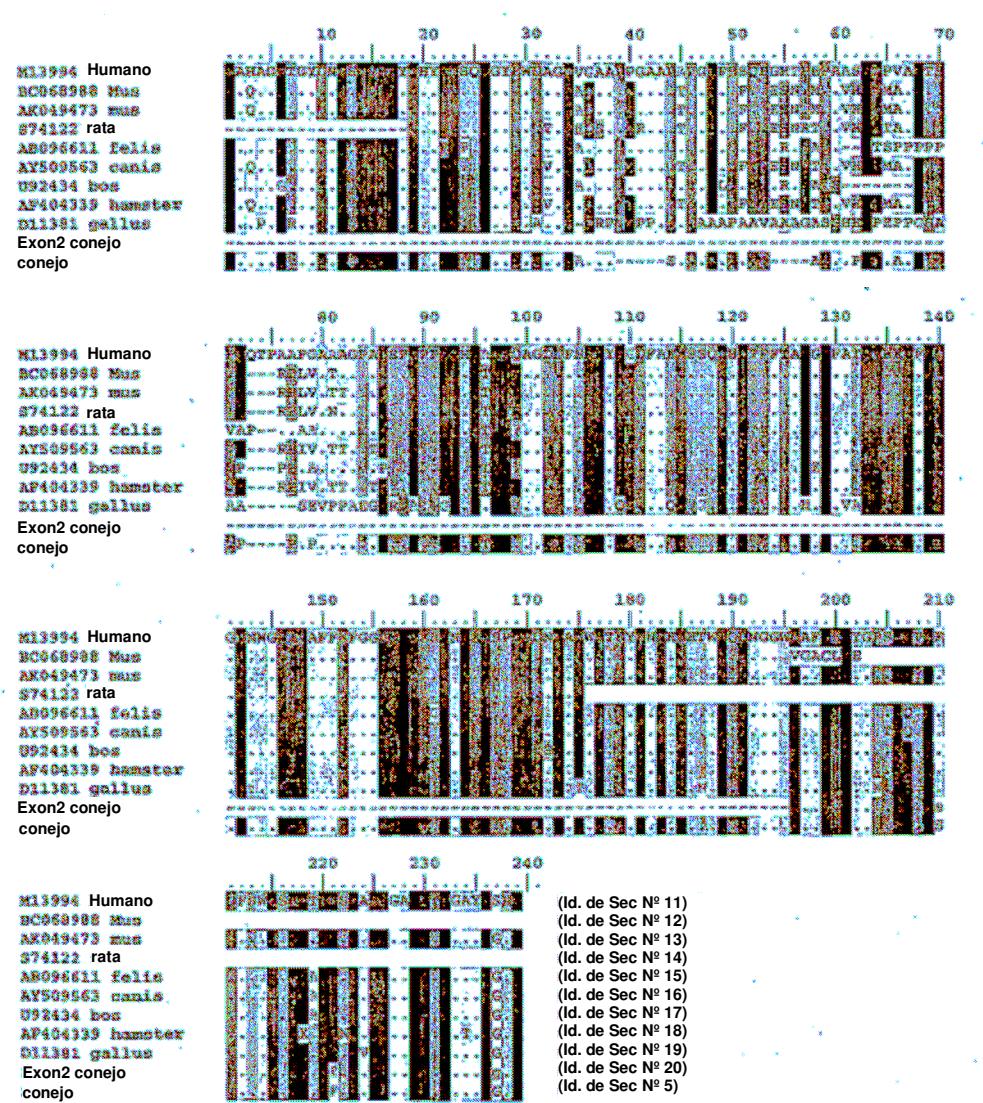


FIG.2 (ID. DE SEC. N°:1)



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 ACACACCATT CCTCCCGACT ACAGGAACAT GATCGGGCGAGG GGGCCCGTGA
61 AACAGACTTT GAAATTTGAC CTTCTCAAAGT TGGCGGGAGA CGTGGGAGTCC AACCCAGGGC
121 CCATGGCCCA CGCCGGGGGC ACTGGCTATG ATAATCGCGA AATTCATG AAGTATATTC
181 ACTACAAAGCT CTCTCAAAGA CGATCGAGT GGGATCGGGG GGACCGTGGC GCTGCCACAC
241 CTGGACCTGC CGCGGCTCCA GCGCTCTTA GCAGGCCAGCC GGGCCACACA CCTCACACCG
301 CTGCGCTCCAG GGATCGCGTG CGACCGACCA GCGCTCTGCA AACTCCCGCC GCGCCCTGGGG
361 CTGCGAGCGG CGCCCGCTTG TCCCGGCTGC CGCCCTGTGCG CGACCTCAGC CTGCGGCAGG
421 CGGGCGACGA CTTCAGCGAGG CGCTACAGAA GAGACTTTGC CGAATATTC CGCCCGCTCC
481 ATCTGACCCC CTTCACCGCA CGAGCGAGGT TGCACACCGT GGTGGAAGAA CTTTCCGCG
541 ACGGTGTGAA CTGGGGCCCG ATCGTTGCGT TTTTGAGTT CGGGGGGGTT ATGTGCGTGG
601 AATCAGTGAA CGCGGAAATG AGTCCCTTGG TCGACAAACAT AGCTCTTTGG ATGACAGAGT
661 ACCTGAAACCG GCATCTCCAT ACTTGAAATAC AGGACAAACGG AGGATGGGAT GCTTTGGTG
721 AGCTGTACCG CCCATCAATG CGCCCTCTGT CGACTTCAG CTGCGCTGCG CGAAGACGCG
781 TCCGTGAGCT CGCTCTTGCG CGCGCTGTGA TCACTTTGGG CGCCATATCTC GGACATAAAT
841 AAGGAGTTCC TTTCCGAAAG TTCCCTATTCT TCAAAAGGTTA TAGGAACTTC GAAATTCAATTA
901 CACCAAGTGTCA AGTAAGCGGG CAAGTCGGT TAATGTCAGT TTCAAAACGT CGACCCATCA
961 CGCGCTGGTGA TGATGGCGGG ATCGTTGTAT ATTCCTTGAC ACCTTTTCGG CATCGCCCTA
1021 AATTCGGCG TCCATCATATT GTGTGAGGAC GTTITATTAC GTGTTTACGA AGCAAAAGCT
1081 AARACCAGGA GCTATTAAAT GGCAACAGTT AACCAAGCTGG TACGCAAAACC ACGTGCGCG
1141 AAGTTGCGA AAAGCAACGT GCCTGCGCTG GAGACATGCC CGCAAAACCG TGGCGTATGT
1201 ACTCGTGTAT ATACTAACAC TCCAAAAAAGG CGAAACTCG CGCTGCGTAA AGTATGCGGT
1261 GTTOGTCGTA CTAACCGTTT CGAAGTGACT TCCATCATCG GTGGTGAAGG TCACAACTTG
1321 CAGGAGCACT CGGTGAGCTT GTGCGGTGGC GTGCGTGTAA AGAACCTCCC GGGTGGTGT
1381 TACCAACACG TACGTGGTGC CGTGAACCTGC TCCCGCGTAA AAGACCGTAA CGAGGCTCGT
1441 TCCAACTATG GCGTGTAGCG TCCATAGGCT TAAAGGAGGAC AATCATGATT GAAACAAGATG
1501 GATTGCAACGC AGGTTCCTCG CGCGCTTGGG TGGAGAGGCT ATTCGGCTAT GACTGGGCAC
1561 AACAGACAAAT CGGCTGCTCT GTGCGCGCG TGTTCCGGT GTCAGGGCAG GGGCGCCCGG
1621 TTCTTTTGT CAAGACCGAC CGTGTGGTGC CGCTGAATGA ACTGCGGAC GRGGCAGCGC
1681 CGCTATCGTG GCTGGCCACG ACGGGCGTTC CTGGCGCAGC TGTGCTCGAC GTTGTCACTG
1741 AAGCGGGAAAG GGACTGGCTG CTATGGGGCG AAGTGGCCGG CGGGGATCTC CTGTCATCTC
1801 ACCTTGCTTC TGCGCGGAAA GTATCCATCA TGGCTGATGC AATGCGGGCG CGCTACACG
1861 TTGATCGGGC TACCTGCCCC TTGCGCCACC AAGCGAAACAA TCGCATCGAG CGAGCACGTA
1921 CTGGATGGA AGCCGATCTT GTGCGATCAGG ATGATCTGGA CGAAGAGCAT CGGGGCTCG
1981 CGCCAGCCGA ACTGTTGCGCC AGGCTCAAGG CGCGCATGCC CGACGGCGAG GRCTCGTGC
2041 TGACCCATGG CGATGCGTGC TTGCGGAATA TCATGGTGA AATGGCCGC TTTTCTGGAT
2101 TCATCGACTG TGGCGGGCTG GTGCGGGCG ACCGCTATCA GGACATAGCG TTGGCTACCC
2161 GTGATATTGC TGAAGAGCTT CGCGCGCGAAT GGGCTGACCG CGTGTGGTGC CTTTACGGTA
2221 TGGCGCTCC CGATTCGGAG CGCTCGCCCT TCTATCGCT TCTTGACCGAG TTCTTCTGAG
2281 AAGTTCTAT TCCGAAGTTC CTATTCCTCA AANGGTATAG GAACTCGCC CTGCGTTCTC
2341 ACAGCGCTGCC TCCCTGGCCA CGAGGAGCCC CGCGCTCTCG GAG

```

- 90 -

FIG.4 (ID. DE SEC. N°:3)

rpsL-neo flanqueada con sitios FRT y FRT2.

```

1 CGTCCATTCC CAACACATGA ACAGCATCTC ACGCCACCTC TGTTGCCCTGC GAAGTTCTA
61 TTCCGAAGTT CCTATTCTCT ACTTAGTATA GGAACCTTCAT TACACCAGTG TCAGTAAGCG
121 GGCAAAAGTCG GTTAATGTCG GTTTCAAAAC GTCCACCCAT CAGGCCCTGGT GATGATGGCG
181 GGATCGTTGT ATATTTCTTG ACACCTTTTC GGCACTGCCCG TAAAATTGG CGTCCTCATA
241 TTGTGTGAGG ACGTTTTATT ACGTGTTTAC GAAGCAAAAG CTAAACACAG GAGCTATTAA
301 ATGGCAACAG TAAACCAGCT GGTACGAAA CCACGTCTC GCAGAGTTGC GAAAAGCAAC
361 GTGCCCTGC CGTGGAGCATG CCCGAAAAA CGTGGCGTAT GTACTCGTGT ATATACTTAC
421 ACTCTCTAAA AACCGAACTC CGCGCTGCGT AAAGTATGCC GTGTTCCGTCT GACTAACGGT
481 TTCCGAAGTGA CTTCTCATCG CGGTGGTGA GGTCACAAAC TGCAAGGAGCA CTCCGTGATC
541 CTGATCCGTG CGGGTCCGTG TAAAGACCTC CGGGGTGTTG GTTACACAC CGTACGTGGT
601 GCGCTTGACT GCTCCGGCGT TAAAGACCGT AAGCAGGCTC GTTCCAAGTA TGGCGTGAAG
661 CGTCCTAAGG CTTAAGGAGG ACAATCATGA TTGAACAAGA TGGATTGCAC GCAGGTTCTC
721 CGGCCGCTTG GGTGGAGAGG CTATTCGCT ATGACTGGGC ACAACAGACA ATCGGCTGCT
781 CTGATGCCGC CGTGTCCCGG CTGTCAGCGC AGGGGGCCCG GGTTCCTTTT GTCAAGACCG
841 ACCTGTCCCGG TGCCCTGAAAT GAACTCGAGG AGCGAGGCGC CGCGCTATCG TGGCTGGCCA
901 CGACGGGCGT TCCCTGGCGA GCTGTGCTCG ACGTTGTCAC TGAAGCGGGA AGGGACTGGC
961 TGCTATTGGG CGAAGTGC CGGGCAGGATC TCTGTCTCATC TCACCTTGCT CCTGCCGAGA
1021 AAGTATCCAT CATGGCTGAT GCAATGCCGC GGCTGCATAC GCTTGATCCG GCTACCTGCC
1081 CATTGACCA CCAAGCGAAA CATGCGCATCG AGCGAGCACG TACTCGGATG GAAGCCGGTC
1141 TTGTCGATCA GGATGATCTG GACGAAGAGC ATCAGGGGCT CGCGCCAGCC GAACTGTTCG
1201 CCAGGCTCAA GGCGCGCATG CCCGACGGCG AGGATCTCGT CGTGACCCAT GGCGATGCC
1261 GCTTGCCGAA TATCATGGT GAAAATGGCC GCTTTCTGG ATTATCGAC TGTGGCCGGC
1321 TGGGTGTGGC GGACCGCTAT CAGGACATAG CGTTGGCTAC CCGTGATATT GCTGAAGAGC
1381 TTGGCGGGGA ATGGGCTGAC CGCTTCTCG TGCTTTACGG TATCGCCGCT CCCGATTTCG
1441 AGCGCATCGC CTTCTATCGC CTTCTGACG AGTTCTCTG AGAAGTTCCCT ATTCCGAAGT
1501 TCCATTCTC TAGAAAGTAT AGGAACCTCC CTGAGAAGGA TGTGGAGGC CAAGAGACAA
1561 GCGCGCCGTG GCGCTGCTC

```

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 GAACTCGAAAG TTCTTATTCC GAAAGTTCTTA TTCTCTACTT AGTATAGGAA CTTCAGGTGA
61 ACCAGACTTT GAAATTGTAC CTTCCTCACT TGGCGGGAGA CGTGGAGTCC AACCCAGGGC
121 CCATGGCCCA CGCCGGCGC ACTGGCTATG ATATATCGCGA AATTGTCATG AAGTATATTTC
181 ACTACAGCT CTCTCAAAGA GGATACGAGT GGGATGCGGG GGACGTCGGC GCAGCTCCAC
241 CTGGAGCTGC CGCGGCCCTT GGCACTTTTA GCAGCCAGGCC GGGCCACACA CCTCACACCG
301 CTGCCCTCCAG GGATCCGGTG GCACGGACCA GCGCTCTGCA AACTCCCGCC GCGCCCTGGGG
361 CTGCAGCGGG TCCCGCCCTG TCCCCGGTGC CCGCTGTGGT GCACCTCACG CTGCGGCGAGG
421 CGGGCGACGG CTTCAGCAGG CGCTACAGAA GAGACTTTGC CGAAATGTC CGCCAGCTCC
481 ATCTGACCCCG CTTCACCGCA CGAGGGAGGT TCGCCACCGT GGTCGAAGAA CTTTTCCCGG
541 ACGGTGTGAA CTGGGGCCGC ATCGTTGCCT TTTTTGAGGT CGGGGGGGTT ATGTGGCTGG
601 AATCACTGAA CGCGAAATG AGTCCCTTGG TCGACACAT AGCTCTTTGG ATGACAGAGT
661 ACCTGAACCG GCATCTGCAT ACTTGGATAC AGGACAAACGG AGGATGGGAT GCTTTGTG
721 AGCTGTACGG CCCATCAATG CGCCCCCTGTG TGCACTTCAG CTGGTTGTCC CTGAAGACCG
781 TCCCTGAGCCCT CGCTCTGTG GGCCCTGTG TCACTTTGGG CGCCTATCTC GGACATAAAT
841 AAGAAGTTCC TATTCGGAAAG TTCTTATTCT CTAGAAGTA TAGGAACCTTC CTGGAGGAAT
901 TC

```

FIG.6 (ID. DE SEC. N°:5)

MAHAGRTGYDNEIVMKYIHYKLSQRGYEWGDAGDAGAASAPGVPSQPAAPRDPAARTSP
PPPPAAAGPALSPPVPPVHLTLRQAGDDFSRRDFAEMSSQLHLTPFTARGRFATVVEEL
FRDGVNWGRIVAFFEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWMTEYLNRHLHTWIQDNGGWDAFV
ELYGPSVRPLSDPSWVSLKTLFSLALIGACITLGAYLGHK*

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.

aggtgaagcagactttgaattttgaccttctcaagttggcgggagacgtggagtccaaaccca
ggggccatggcccacgcgcggcgactggctatgataatcgcgaaattgtcatgaagtatat
tcactacaagctctctcaaagaggatacgagtggatgcggggacgtcgccgcagctccac
ctggagctggccggccctggcatcttagcagccagccggccacacacccctcacaccgct
gcctccaggatccggatggacggacagccctctgcaaaactcccgccggccctgggctgc
agcgggtccgccttgcctccggatggcccccctgtggatgcacccctcacgtgcggcaggccgg
acgacttcagcaggcgctacagaagagactttggcgaaatgtcccgccagctccatctgacc
cccttcacccgacggggagggttcgcacccgtggatgcagaactttcccgacgggtgtgaa
ctggggccgcategttgccttttgcgtggatggccatgtgcgtggatgcacccatctgaa
gcgaaatgagtcccttggatgcacccatagctcttggatgcacccatctgaaatcgtgaa
ctgcatacttgatgcaggacaacggaggatggatggatgttttttttttttttttttttt
aatgcggcccttgcgttgcacttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
tggggccctgtatcactttggcgctatctcgacataaataa

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.

aggtgaagcagactttgaattttcaccttctcaagttggcgcccagacgtggagtccaaaccca
gggcccattggcgacgctggagaacaggtacgataaccggagatagtatgaagtacat
ccattataagctgtcgagggctacgagtggatgcggagatgtggcgccgcggcc
cgggggccggccggccggccatcttcctcgagccggcacacgcggccatacagcc
gcatcccggaaccggcgtcgccaggacctcgccgtcgagacccggctgcggcc
cgccggccctgcgtcagccggtgcacctgtggtccacctgacccctcgccaggcc
acgacttcccgccgtaccggccggacttgcggagatgtccaggcagctgcacccgt
cccttacccggccggacgtttgccacgggtggaggagctttcaggacgggtgaa
ctggggaggattgtggccttcttgatgttcgtgggtcatgtgtggagagcgtcaacc
gggagatgtcgccctggacaacatcgccctgtggatgactgagttacccgt
ctgcacacccgtggatccaggataacggaggctggatgccttgcactgtacggcc
catgcggccctgtttgatttctctggctgtctgtgaagactctgctcagttggcc
tggagttgcattcacccctgggtgcctatctggccacaagtga

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.

Aggtgaagtggatcttctcgccgtggagctgaaaacacaccatcgctcccgactacagg
aacatgatcgggcaggggccgtgaaacagactttgaatttgcacccctcaagttggccggg
agacgtggagtccaaacctcaggccatggccacgcggccgcactggctatgataatcgcc
aaatgtcatgaagtatattcaactacaagctctctaaagaggatacgagtggtatgcgggg
gaotgtggcgtgccccacccctggagctgcggccgtccaggcatcttagcagccagccgggg
ccacacacccacccctcacaccgctgcctccaggatccggatggcaggaccagccctctgaaaactc
ccgcgcgcgcctgggctgcaggggtccgccttgcgtcccggtgcgcctgtggtcaccc
acgctgoggcaggccggcgcacgacttcagcaggcgtacagaagagactttggccaaatgtc
ccgcgcgtccatctgaccccttcacccgcacgaggaggttcgcacccgtggtcgaagaac
ttttccgcgcacgggtgtgaactggggcgcacatgttgccttttttagttgcgttgggggggttatgt
tgcgtgaatcagtgaaccgcgaaatgagttcccttggtcacacatagctttggatgac
agagttacccgtgaaccgcacatgcatacttggatcacggacaacggaggatgggatgttttg
tttagctgtacggcccatcaatgogcccttggacttcagctgttgcctgtaaagacg
ctcctgagactcgctttgtggcgcctgtatcactttggcgcctatctcgacataata
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

aggtaagcgagaaagcgaccggtaaaacagactttgaatttgaccttctcaagttggcg
ggagacgtggagtccaaacccagggccatggcgacgcgtggagaacagggtacgataaccg
ggagatagtgtatgaagtacatccattataagctgtcgacagagggctacgagtggatgcgg
gagatgtggggccggccggccggccggccggccggccggccggccatcttctctcgacgg
gggcacacgcggccatcacagccgcattccgggacccggtcgcccaggacctcgccgctgcagac
ccggcgtccccccggcgccggccggccggccgtcgacgtcagcccggtgccacctgtggccacc
tgaccctccgcaggccggcgacgacttcccgccgctaccgcggcgacttgcggagatg
tccaggcagctgcacctgcacgcgccttcaccgcgcgggacgctttgccacggtggagga
gtcttcaggacggggtaactggggaggattgtggcattttgagttcggtggagatgc
tgtgtgtggagagcgtcaaccggagatgtcgccctgtggacaacatcgccctgtggatg
actggatcacctgaacccggacacccggatccggatccggataacggaggctggatgcctt
tgtggactgtacggcccccagcatgcggcctgtttgatttctctggctgtctctgaaga
ctctgctcagttggccctggagcttgcacccctgggtgcctatctggccacaag
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
10 autoescindible F2A - bcl2 humano con codones optimizados.

aggtgaagtggatottctcgccgtggagctgaaacacaccatcgctccgactacagg
aacatgatcgccggggggcccgagcaaagcgaccggtaaacagactttgaattttgaccc
tctcaagtggcgggagacgtggagttccaaaccaggccatggcccaacgcggggcgcactg
gctatgataatcgogaatttgtcatgaagtatattactacaagctctcaaaaggagatac
gagtggatgcggggacgtggcgctgccccacctggagctgcccggctccaggcattt
tagcagccagccggccacacacccctacaccgctgcctccaggatccggtgccacggacca
gcctctgcaaactcccgccgccccctgggctgcaggggtcccgccctgtccccgggtgc
ccctgtggtgcacctcacgctggcgaggccggcagcacttcagcaggcgtacagaagaga
ctttgcgaaatgtcccgccagctccatctgaccccttcacccgcacagggaggttcgcca
ccgtggtcgaagaactttccgcacgggtgtgaactggggccatcggtgccttttttag
tttgggggggttatgtgcgtggaatcagtgaaccggaaaatgagtcccttggtegacaacat
agctcttggatgacagagtacctgaaccggcatctgcatacttggatcacggacaacggag
gatgggatgtttgttgcgttgcggccatcaatgcggcccttggacttcagctgg
ttgtccctgaagaogctctgagcctcgctttgtggcgctgtatcacattggggccta
tctcqacataaaataa