

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 858 978**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2012 E 18176096 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2020 EP 3424947**

54 Título: **Ratones con receptores de linfocitos T genéticamente modificados**

30 Prioridad:

28.10.2011 US 201161552582 P

06.04.2012 US 201261621198 P

14.09.2012 US 201261700908 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.09.2021

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

MACDONALD, LYNN;
MURPHY, ANDREW, J.;
MCWHIRTER, JOHN;
TU, NAXIN;
VORONINA, VERA;
GURER, CAGAN;
MEAGHER, KAROLINA y
STEVENS, SEAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 858 978 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ratones con receptores de linfocitos T genéticamente modificados

5 **Campo de la invención**

Se proporciona en el presente documento una célula de roedor aislada que comprende en su genoma loci de genes variables de receptores de linfocitos T (TCR) humanos o humanizados.

- 10 Se divulga en el presente documento un animal no humano modificado genéticamente, por ejemplo, un roedor (por ejemplo, un ratón o una rata), que comprende en su genoma loci de genes variables de receptores de linfocitos T humanos o humanizados (TCR) (por ejemplo, loci de genes TCR α y TCR β variables y/o loci de genes TCR δ y TCR γ variables), y expresan polipéptidos TCR humanos o humanizados (por ejemplo, polipéptidos TCR α y TCR β y/o polipéptidos TCR δ y TCR γ) procedentes de los loci de genes TCR variables humanos o humanizados. Un animal no humano con loci de genes TCR variables humanos o humanizados como se describe en el presente documento comprende segmentos de genes de la región TCR variable humana sin reorganizar (por ejemplo, segmentos V, D, y/o J) en un loci de un gen TCR endógeno no humano. Se divulgan en el presente documento embriones, tejidos y células (por ejemplo, linfocitos T) que comprenden loci de genes variables de TCR humanos o humanizados y expresan polipéptidos TCR humanos o humanizados. Se divulgan también métodos para producir el animal no humano modificado genéticamente que comprende loci de genes variables de TCR humanos o humanizados; y métodos para usar animales no humanos, embriones, tejidos y células que comprenden loci de genes TCR variables humanos o humanizados y expresan polipéptidos TCR humanos o humanizados procedentes de estos loci.

Antecedentes de la invención

- 25 En la respuesta inmunoadaptativa, se reconocen antígenos extraños por las moléculas receptoras en los linfocitos B (por ejemplo, inmunoglobulinas) y linfocitos T (por ejemplo, receptores de linfocitos T o TCR). Aunque los anticuerpos reconocen patógenos en la sangre y el espacio extracelular en el curso de la respuesta inmunohumoral, la destrucción de patógenos en el interior de las células está mediada en el curso de la respuesta inmunocelular por los linfocitos T.

- 30 Los linfocitos T reconocen y atacan los antígenos que se les presentan en el contexto de un Complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) sobre la superficie celular. El reconocimiento del antígeno está mediado por los TCR expresados sobre la superficie de los linfocitos T. Dos clases principales de linfocitos T sirven a esta función: linfocitos T citotóxicos, que expresan la proteína superficial celular CD8, y linfocitos T auxiliares, que expresan la proteína superficial celular CD4. Los linfocitos T citotóxicos activan las cascadas de señalización que dan como resultado la destrucción directa de la célula presentadora del antígeno (en el contexto de MHC I), mientras que los linfocitos T auxiliares se diferencian en varias clases, y su activación (estimulada por el reconocimiento del antígeno presentado en el contexto de MHCII) da como resultado la destrucción de patógenos mediada por macrófagos y la estimulación de la producción de anticuerpos por linfocitos B.

- 40 Debido a su especificidad por antígenos, los anticuerpos se estudian ampliamente en la actualidad para su potencial terapéutico contra numerosos trastornos humanos. Para generar anticuerpos capaces de neutralizar dianas humanas, evitando simultáneamente a la vez la activación de respuestas inmunitarias contra dichos anticuerpos, los científicos han concentrado sus esfuerzos en producir inmunoglobulinas humanas o humanizadas. Una manera de producir anticuerpos humanizados *in vivo* es utilizando VELOCIMMUNE® de ratón, un ratón humanizado que comprende (1) un repertorio de segmentos de inmunoglobulina V, D, y J humanas sin reorganizar unidas operativamente entre sí y una región constante de ratón en el locus endógeno de la cadena pesada de inmunoglobulina de ratón y (2) un repertorio de segmentos V κ y J κ humanos sin reorganizar unidos operativamente entre sí y una región κ constante de ratón en el locus endógeno de la cadena ligera κ de inmunoglobulina de ratón. Por tanto, los ratones VELOCIMMUNE® proporcionan una fuente rica de dominios variables de anticuerpos reorganizados muy diversos para su uso en el diseño mediante ingeniería genética de anticuerpos humanos.

- De forma similar a un anticuerpo, un receptor de linfocitos T comprende una región variable, codificada por loci sin reorganizar (loci α y β , o loci δ y γ) que comprende segmentos de la región variable V(D)J, y esta región variable confiere, tras los linfocitos T, su especificidad de unión a antígenos. De forma también similar a un anticuerpo, la especificidad de TCR por su antígeno puede utilizarse para el desarrollo de novedosas terapéuticas. Por tanto, existe una necesidad en la técnica de animales no humanos (por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratas o ratones) que comprenden segmentos de genes de la región variable de los linfocitos T humanos sin reorganizar capaces de reorganizarse para formar genes que codifican dominios variables de receptores de linfocitos T humanos, incluyendo dominios que son análogos entre sí, e incluyendo dominios que se unen específicamente a un antígeno de interés. Existe también una necesidad de animales no humanos que comprendan loci de regiones variables de linfocitos T que comprendan humanizaciones conservativas, incluyendo animales no humanos que comprendan segmentos de genes humanos sin reorganizar que pueden reorganizarse para formar genes de regiones variables de receptores de linfocitos T que se unen a secuencias de genes constantes de receptores de linfocitos T no humanos (endógenos). Sigue habiendo una necesidad de animales no humanos que sean capaces de generar un repertorio diverso de secuencias variables de receptores de linfocitos T humanos. Existe una necesidad de animales no humanos que sean

capaces de reorganizar la mayoría o todos los segmentos de la región variable de receptores de linfocitos T funcionales, en respuesta a un antígeno de interés, para formar polipéptidos de receptores de linfocitos T que comprendan dominios variables completamente humanos.

El documento WO 2007/131092 se refiere a un receptor de linfocitos T, así como polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinante, células hospedadoras y composiciones farmacéuticas relacionadas o que codifican el TCR. Cohen y col., ((2006), Cancer Research, 66(17):8878-8886) explores chimeric human and mouse T cell receptor function and expression. Madsen et al., ((1999), Nature Genetics, 23(3):343-347) se refiere a un modelo humanizado para la esclerosis múltiple usando un receptor de linfocitos T humanos. Kawamura y col., ((2008), Journal of Immunology, 181(8):5462-5472) se refiere al desarrollo de linfocitos T transgénicos del receptor de linfocitos T humanos en el timo y la periferia. Pietropaolo et al., ((2008), Diabetes, 57(11):2872-2882) se refiere a un modelo de ratón transgénico del receptor de linfocitos T-MHC de clase II para el estudio de diabetes. Baker y col., ((1996), Journal of Neuroscience Research, 45(4):487-491) se refiere a vectores de expresión de linfocitos T y su uso en la construcción de transgenes del receptor de linfocitos T específicos de proteína básica de mielina quiméricos.

Sumario de la invención

Se divulgan animales no humanos, por ejemplo, roedores, que comprenden células no humanas que expresan moléculas humanizadas que funcionan en la respuesta inmunitaria celular. También se divulgan animales no humanos que comprenden loci de genes variables de TCR sin reorganizar. Se divulgan sistemas *in vivo* e *in vitro* que comprenden células de roedor humanizadas, en las que las células de roedores expresan una o más moléculas del sistema inmunitario humanizadas. También se divulgan loci de roedores de TCR humanizados sin reorganizar que codifican proteínas del TCR humanizadas.

En un aspecto, se proporciona en el presente documento una célula de roedor (por ejemplo, una célula de ratón o de rata) aislada genéticamente modificada que comprende en su genoma (a) un locus de genes variables de TCR α variable sin reorganizar que comprende al menos un segmento V α humano y al menos un segmento J α humano unidos operativamente a una secuencia de gen constante de TCR α de roedor (por ejemplo, un ratón o una rata) en un locus de gen variable de TCR α de roedor endógeno y/o (b) un locus de genes variables de TCR β variable sin reorganizar que comprende al menos un segmento V β humano, al menos un segmento D β humano y al menos un segmento J β humano, unidos operativamente a una secuencia de gen constante de TCR β de roedor (por ejemplo, un ratón o una rata) en un locus de gen variable de TCR β de roedor endógeno; en el que los segmentos de la región variable de linfocitos T humanos sin reorganizar son capaces de reorganizarse en un linfocito T para formar genes que codifican dominios variables del receptor de linfocitos T que se unen específicamente a un antígeno de interés.

En una realización, el locus del gen TCR α variable sin reorganizar sustituye el locus endógeno del gen TCR α variable de roedor en un locus endógeno del gen TCR α variable. En una realización, el locus del gen TCR β variable sin reorganizar sustituye el locus endógeno del gen TCR β variable de roedor en un locus endógeno del gen TCR β variable. En una realización, los segmentos V α y J α endógenos de roedor son incapaces de formar una secuencia V α /J α reorganizada. En una realización, los segmentos V β , D β , y J β endógenos de roedor son incapaces de reorganizarse para formar una secuencia V β /D β /J β reorganizada. En una realización, la célula de roedor aislada comprende una delección de tal manera que el genoma de la célula no comprende un segmento V α endógeno funcional y J α endógeno funcional. En una realización, la célula de roedor aislada comprende una delección de tal manera que el genoma de la célula no comprende un segmento V β funcional, un segmento endógeno D β funcional, y un segmento J β endógeno funcional. En una realización, la célula de roedor aislada comprende una delección de todos los segmentos V α y J α endógenos funcionales. En una realización, la célula de roedor aislada comprende una delección de todos los segmentos V β , D β , y J β endógenos funcionales. En algunas realizaciones, los segmentos V α y J α humanos se reorganizan para formar una secuencia V α /J α reorganizada. En algunas realizaciones, los segmentos V β , D β , y J β se reorganizan para formar una secuencia V β /D β /J β reorganizada. Por tanto, en diversas realizaciones, la célula de roedor aislada expresa un receptor de linfocitos T que comprende una región variable humana y una región constante de roedor en una superficie de un linfocito T.

En algunos ejemplos, linfocitos T del animal no humano que experimentan desarrollo de linfocitos T en el timo para producir linfocitos T CD4 y CD8 individuales positivos. En algunos ejemplos, el animal no humano comprende una relación normal de linfocitos T CD3⁺ esplénicos a esplenocitos totales. En diversos ejemplos, el animal no humano genera una población de linfocitos T con memoria central y linfocitos T con memoria efectora en la periferia.

En un ejemplo, el locus del gen TCR α variable sin reorganizar en el animal no humano descrito en el presente documento comprende 61 segmentos J α humanos y 8 segmentos V α humanos. En otro ejemplo, el locus del gen TCR α variable sin reorganizar en el roedor comprende un repertorio completo de segmentos J α humanos y un repertorio completo de segmentos V α humanos.

En un ejemplo, el locus del gen TCR β variable sin reorganizar en el animal no humano descrito en el presente documento comprende 14 segmentos J β humanos, 2 segmentos D β humanos, y 14 segmentos V β humanos. En otro ejemplo, el locus del gen TCR β variable sin reorganizar en el animal no humano comprende un repertorio completo de segmentos J β humanos, un repertorio completo de segmentos D β humanos, y un repertorio completo de segmentos

Vβ humanos.

En un ejemplo adicional, el animal no humano descrito en el presente documento (por ejemplo, un roedor) comprende además secuencias de nucleótidos de segmentos TCRδ variables humanos en un locus TCRα humanizado. En un ejemplo, el animal no humano (por ejemplo, roedor) comprende además unos segmentos Vδ, Dδ, y Jδ humanos, por ejemplo, un repertorio completo de segmentos Vδ, Dδ, y Jδ humanos en el locus TCRα humanizado.

En un ejemplo, el animal no humano retiene un locus TCRα y/o TCRβ endógeno no humano, en el que el locus es un locus no funcional.

En un ejemplo, el animal no humano es un roedor. En un ejemplo, el roedor se selecciona entre un roedor y una rata. En un ejemplo, el roedor es un ratón.

Se divulga en el presente documento un ratón genéticamente modificado que comprende en su genoma (a) un locus de genes variables de TCRα variable sin reorganizar que comprende un repertorio de segmentos Jα humanos y un repertorio de segmentos Vα humanos, unido operativamente a una secuencia de gen constante de TCRα no humano (por ejemplo, ratón o rata) y/o (b) un locus de genes variables de TCRβ sin reorganizar que comprende un repertorio de segmentos Jβ humanos, un repertorio de segmentos Dβ humanos y un repertorio de segmentos Vβ humanos, unido operativamente a una secuencia de gen constante de TCRβ no humano (por ejemplo, ratón o rata). En un ejemplo, el ratón comprende un repertorio completo de segmentos Vα humanos. En un ejemplo, el ratón comprende un repertorio completo de segmentos Vβ humanos. En un ejemplo, el ratón comprende un repertorio completo de segmentos Vα humanos y segmentos Jα humanos. En un ejemplo, el ratón comprende un repertorio completo de segmentos Vα humanos, segmentos Jα humanos, segmentos Vβ humanos, segmentos Dβ humanos, y segmentos Jβ humanos.

En un ejemplo, el ratón comprende al menos un segmento Vα endógeno de ratón y al menos un segmento Jα endógeno de ratón, en el que los segmentos endógenos son incapaces de reorganizarse para formar una secuencia Vα/Jα reorganizada, y comprende también al menos un segmento Vβ endógeno de ratón, al menos un segmento Dβ endógeno de ratón, y al menos un segmento Jβ endógeno de ratón, en el que los segmentos endógenos son incapaces de reorganizarse para formar una secuencia Vβ/Dβ/Jβ reorganizada.

En un ejemplo, el locus del gen TCRα variable sin reorganizar que comprende segmentos de la región TCRα variable humana sustituye los genes TCRα variables de ratón en el locus endógeno TCRα variable de ratón y el locus del gen TCRβ variable sin reorganizar que comprende segmentos de la región TCRβ variable humana que sustituyen los genes TCRβ variables de ratón en el locus endógeno TCRβ variable de ratón.

En un ejemplo, los segmentos Vα y Jα humanos se reorganizan para formar una secuencia Vα/Jα humana reorganizada, y los segmentos Vβ, Dβ, y Jβ se reorganizan para formar una secuencia Vβ/Dβ/Jβ reorganizada. En un ejemplo, la secuencia Vα/Jα reorganizada está unida operativamente a una secuencia de la región de TCRα constante de ratón. En un ejemplo, la secuencia Vβ/Dβ/Jβ humana reorganizada está unida operativamente a una secuencia de la región TCRβ constante de ratón. Por tanto, en diversos ejemplos, el ratón expresa un receptor de linfocitos T sobre la superficie de un linfocito T, en el que el receptor de linfocitos T comprende una región variable humana y una región constante de ratón.

En un ejemplo, el ratón comprende además un repertorio segmentos de la región TCRδ variable humana (por ejemplo, segmentos Vδ, Jδ, y Dδ humanos) en un locus TCRα humanizado. En un ejemplo, el repertorio de segmentos de la región TCRδ variable humana es un repertorio completo de segmentos de la región variable TCRδ humana. En un ejemplo, los segmentos de la región TCRδ variable humana están en el locus TCRα endógeno. En un ejemplo, los segmentos de la región TCRδ variable humana sustituyen los segmentos los segmentos de la región TCRδ variable endógena de ratón.

En un ejemplo, el ratón genéticamente modificado expresa un receptor de linfocitos T que comprende una región variable humana y una región constante de roedor sobre una superficie de un linfocito T. En un ejemplo, los linfocitos T del ratón experimentan desarrollo de linfocitos T tímicos para producir linfocitos T CD4 y CD8 individuales positivos. En un ejemplo, el ratón comprende una relación normal de linfocitos T CD3+ esplénicos a esplenocitos totales; en un ejemplo, el ratón genera una población de linfocitos T con memoria central y linfocitos T con memoria efectora para un antígeno de interés.

Se proporcionan también métodos para preparar roedores (por ejemplo, ratones o ratas) descritos en el presente documento.

En un ejemplo, se divulga en el presente documento un método para preparar un roedor humanizado (por ejemplo, un ratón o rata), que comprende sustituir los segmentos de las regiones TCRα y TCRβ variables de roedor, pero no genes constantes de roedor, con segmentos de las regiones TCRα y TCRβ variables sin reorganizar, unos loci TCR endógenos de roedor. En un ejemplo, el método comprende sustituir segmentos de la región TCRα variable de roedor

(V α y/o J α) con segmentos de la región TCR α variable humana (V α y/o J α), en el que los segmentos de la región TCR α variable están unidos operativamente a un gen de la región TCR constante no humana para formar un locus TCR α humanizado; y los segmentos de la región TCR β variable de sustitución de roedor (V β y/o D β y/o J β) con los segmentos de la región TCR β variable humana (V β y/o D β y/o J β), en el que los segmentos de la región TCR β variable están unidos operativamente a un gen de la región constante no humana para formar un locus TCR β humanizado. En un ejemplo, el roedor humanizado es un ratón y la línea germinal del ratón comprende los segmentos de la región TCR α variable humana unidos operativamente a una secuencia constante TCR α endógena de ratón en un locus TCR α endógeno; y la línea germinal del ratón comprende segmentos de la región TCR β variable humana unidos operativamente a una secuencia constante de TCR β endógena de ratón en un locus TCR β endógeno.

Se divulga en el presente documento un método para preparar animales no humanos genéticamente modificados (por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratón o rata) que expresan un receptor de linfocitos T que comprende una región variable humana o humanizada y una región constante no humana (por ejemplo, de roedor) sobre una superficie de un linfocito T que comprende: sustituir en un primer animal no humano un locus endógeno de un gen TCR α variable no humano con un locus de gen TCR α variable humanizado sin reorganizar que comprende al menos un segmento V α humano y al menos un segmento J α humano, en el que el locus del gen TCR α variable humanizado está unido operativamente a una región constante TCR α endógena no humana; sustituyendo en un segundo animal no humano un locus del gen TCR β variable endógeno no humano con un locus del gen TCR β variable humanizado sin reorganizar que comprende al menos un segmento V β humano, al menos un segmento D β humano, y al menos un segmento J β humano, en el que el locus del gen TCR β variable humanizado está unido operativamente a la región TCR β constante endógena; y cruzar el primer y el segundo animal no humanos para obtener un animal no humano que exprese un receptor de linfocitos T que comprende una región variable humana o humanizadas y una región constante no humana.

En un ejemplo del método, los segmentos V α y J α no humanos (por ejemplo, de roedor) endógenos son incapaces de reorganizarse para formar una secuencia V α /J α reorganizada y los segmentos V β , D β , y J β no humanos (por ejemplo, de roedor) endógenos son incapaces de reorganizarse para formar una secuencia V β /D β /J β reorganizada. En un ejemplo del método, los segmentos V α y J α humanos se reorganizan para formar una secuencia V α /J α reorganizada y los segmentos V β , D β , y J β se reorganizan para formar una secuencia V β /D β /J β reorganizada. En un ejemplo del método, el locus del gen TCR α variable humanizado reorganizado comprende 61 segmentos J α humanos y 8 segmentos V α humanos, y el locus del gen TCR β variable humanizado sin reorganizar comprende 14 segmentos V β humanos, 2 segmentos D β humanos, y 14 segmentos J β humanos. En un ejemplo del método, el locus del gen TCR α variable humanizado sin reorganizar comprende un repertorio completo de segmentos J α humanos y un repertorio completo de segmentos V α humanos, y el locus del gen TCR β variable humanizado sin reorganizar comprende un repertorio completo de segmentos V β humanos, un repertorio completo de segmentos D β humanos, y un repertorio completo de segmentos J β humanos.

En el método divulgado en el presente documento, los linfocitos T del animal no humano (por ejemplo, roedor) pueden experimentar desarrollo de linfocitos T tímicos para producir linfocitos T CD4 y CD8 individuales positivos. El animal no humano (por ejemplo, roedor) puede comprender una relación normal de linfocitos T CD3+ esplénicos a esplénocitos totales. El animal no humano (por ejemplo, roedor) puede generar una población de linfocitos T con memoria central y linfocitos T con memoria efectora para un antígeno de interés.

En algunos ejemplos, la sustitución del locus del gen TCR α variable endógeno no humano descrito en el presente documento se realiza en una célula ES individual y la célula ES individual se introduce en un embrión no humano (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o rata) para preparar un animal no humano (es decir, el primer animal no humano, por ejemplo, el primer roedor) genéticamente modificado; y la sustitución del locus del gen TCR β variable endógeno no humano descrito en el presente documento se realiza en una célula ES individual, y la célula ES individual se introduce en un embrión no humano (por ejemplo, roedor, por ejemplo, un ratón o rata) para preparar un animal no humano (es decir, el segundo animal no humano, por ejemplo, el segundo roedor) genéticamente modificado. En un ejemplo, el primer roedor y el segundo roedor se cruzan para formar una progenie, en el que la progenie comprende en su línea germinal un locus TCR α variable humanizado y un locus TCR β variable humanizado.

En un ejemplo del método, el roedor es un ratón. Por tanto, la presente invención también proporciona un método para preparar un ratón genéticamente modificado.

Se proporciona también en el presente documento células, por ejemplo, linfocitos T aislados (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T auxiliares, linfocitos T con memoria, etc.), derivados de roedores (por ejemplo, ratones o ratas) descritos en el presente documento. Se divulgan también tejidos y embriones derivados de animales no humanos descritos en el presente documento.

Se divulga en el presente documento un método para preparar un dominio TCR variable humano que comprende modificar genéticamente un roedor, como se describe en el presente documento que comprende un locus TCR α humanizado y/o un locus TCR β humanizado, manteniendo el roedor en condiciones suficientes para formar un linfocito T, en el que el linfocito T expresa un dominio TCR α y/o TCR β variable humano.

Se divulga en el presente documento un método para preparar una secuencia de ácido nucleico que codifica un

dominio TCR variable humano que se une a un epítipo de interés, que comprende exponer a un animal no humano como se describe en el presente documento a un epítipo de interés, manteniendo el animal no humano en condiciones suficientes para el animal para presentar el epítipo de interés a un TCR humanizado del animal, e identificar un ácido nucleico del animal que codifica un polipéptido de un dominio TCR variable humano que se une al epítipo de interés.

Se divulga el uso de un animal no humano como se describe en el presente documento para preparar un receptor TCR humanizado. En un ejemplo, se divulga el uso de un animal no humano como se describe en el presente documento para preparar un dominio variable TCR humano. En un ejemplo, se divulga el uso de un animal no humano como se describe en el presente documento para preparar una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio variable TCR humano.

En un ejemplo, se divulga el uso de una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio TCR variable humano o un fragmento del mismo para preparar una proteína de unión a antígeno. En un ejemplo, la proteína de unión a antígeno comprende un dominio TCR variable que comprende un dominio TCR α y/o TCR β variable humano que se une a un antígeno de interés.

En un ejemplo, se divulga el uso de un animal no humano, como se describe en el presente documento, para preparar una célula no humana que expresa sobre su superficie un receptor de linfocitos T humanizados.

En un ejemplo, se divulga un receptor de linfocitos T humanizados procedente de un animal no humano, como se describe en el presente documento

En un ejemplo, se divulga una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio TCR variable humano o fragmento del mismo, preparada en un animal no humano, como se describe en el presente documento.

Cualquiera de las realizaciones y aspectos descritos en el presente documento pueden utilizarse juntos entre sí, salvo que se indique otra cosa o sea evidente a partir del contexto. Otras realizaciones serán evidentes para un experto en la técnica a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada. La siguiente descripción detallada incluye representaciones ilustrativas de las diversas realizaciones de la invención, que no son restrictivas de la invención tal como se reivindica. Las figuras acompañantes constituyen una parte de esta memoria descriptiva y, junto con la descripción, sirven únicamente para ilustrar las realizaciones y no limitar la invención.

Breve descripción de los dibujos

La **Fig. 1** representa la interacción en un ratón entre una molécula TCR y una molécula MHC: el panel izquierdo muestra un linfocito T de ratón (parte superior) de un ratón TCR humanizado que comprende un receptor de linfocitos T con dominios TCR variables humanos y dominios TCR constantes de ratón, que reconoce un antígeno (esfera gris) presentado a través de un MHC de clase I mediante una célula presentadora de antígenos (parte inferior); el panel derecho muestra el mismo para un MHC de clase II. Los complejos MHC I y MHC II se muestran junto con sus respectivos correceptores, CD8 y CD4. Las regiones de ratón están en negro y las regiones humanas están en blanco.

La **Fig. 2** representa (no a escala) la organización general de un locus TCR α de ratón (panel superior, primer locus) y de un locus TCR α humano (panel superior, segundo locus). El panel inferior ilustra una estrategia para sustituir segmentos de la región TCR α variable en un ratón (símbolos cerrados) con segmentos de la región TCR α variable humana (símbolos abiertos) en el locus endógeno de ratón en el cromosoma 14; un locus TCR α humanizado que tiene segmentos V α y J α se muestra con una región constante de ratón y un potenciador de ratón; en la realización mostrada, el locus TCR δ se elimina en el curso de la humanización.

La **Fig. 3** representa (no a escala) una estrategia progresiva para la humanización del locus TCR α de ratón, en el que se añaden secuencialmente segmentos de genes de la región TCR α variable en la dirección 5' de una humanización inicial de un locus de ratón eliminado (MAID1540). La secuencia de ratón está indicada por símbolos cerrados; la secuencia humana está indicada por símbolos abiertos. MAID se refiere a un número ID de alelo modificado. TRAV=segmento V α de TCR, TRAJ=segmento J α de TCR (hTRAJ=TRAJ humano), TRAC=dominio C α de TCR, TCRD=TCR δ .

La **Fig. 4** es una representación detallada (no a escala) de estrategia de humanización progresiva del locus TCR α . La **Fig. 4A** representa la delección de los segmentos V y J de TCR α de ratón; La **Fig. 4B** representa la estrategia para la inserción de 2 segmentos V y 61 segmentos J humanos en el locus TCR α de ratón eliminado; La **Fig. 4C** representa la estrategia para la inserción de segmentos V humanos adicionales, dando como resultado un total de 8 segmentos V y 61 segmentos J humanos; La **Fig. 4D** representa la estrategia para la inserción de segmentos V humanos adicionales, dando como resultado un total de 23 segmentos V y 61 segmentos J humanos; La **Fig. 4E** representa la estrategia para la inserción de segmentos V humanos adicionales dando como resultado 35 segmentos V y 61 segmentos J humanos; La **Fig. 4F** representa la estrategia para la inserción de segmentos humanos adicionales dando como resultado 48 segmentos V y 61 segmentos J humanos; y la **Fig. 4G** representa la estrategia para la inserción de segmentos humanos adicionales dando como resultado 54 segmentos V y 61

segmentos J humanos. MAID se refiere a un número ID de alelo modificado.

La **Fig. 5** representa (no a escala) una realización de la estrategia de humanización del locus TCR α de ratón, en el que las secuencias TCR δ humanas TCR δ Vs, TCR δ Ds, TCR δ Js, TCR δ enh (potenciador), y TCR δ constante (C)) se colocan también en el locus TCR α humanizado. La secuencia de ratón está indicada por símbolos cerrados; la secuencia humana está indicada por símbolos abiertos. LTVEC se refiere a un vector de direccionamiento grande; hTRD=TCR δ humana.

La **Fig. 6** representa (no a escala) la organización general de unos loci TCR β de ratón (panel superior, primer locus; en el cromosoma 6 humano) y unos loci TCR β humanos (panel superior, segundo locus; en el cromosoma 7 humano). El panel inferior ilustra una estrategia para sustituir segmentos de la región TCR β variable en el ratón (símbolos cerrados) con segmentos de la región TCR β variable humana (símbolos abiertos) en el locus endógeno de ratón en el cromosoma 6 de ratón. El locus TCR β humanizado que tiene los segmentos V β , D β , y J β se muestran con regiones constantes de ratón y un potenciador de ratón; en la realización mostrada, el locus humanizado retiene los genes del tripsinógeno de ratón (rectángulos rellenos); y en particular, la realización muestra, un único segmento V de ratón que se retiene antes de los genes 5' del tripsinógeno de ratón.

La **Fig. 7** representa (no a escala) una estrategia progresiva para la humanización del locus TCR β de ratón, en el que los segmentos de genes de la región TCR β variable se añaden secuencialmente al locus TCR β variable de ratón eliminado. La secuencia de ratón está indicada por símbolos cerrados; la secuencia humana está indicada por símbolos abiertos. MAID se refiere a un número ID de alelo modificado. TRBV o TCRBV= segmento TCR β V.

La **Fig. 8** es una representación detallada de una estrategia de humanización progresiva en el locus TCR β . La **Fig. 8A** representa la estrategia para la eliminación de segmentos TCR β V de ratón; La **Fig. 8B** representa la estrategia para la inserción de 14 segmentos V en el locus TCR β eliminado; La **Fig. 8C** representa la estrategia para la inserción de 2 segmentos D y 14 segmentos J en el locus TCR β (i), seguido por la eliminación del sitio *loxP* (ii), dando como resultado 14 segmentos V, 2 segmentos D y 14 segmentos J humanos; La **Fig. 8D** representa la estrategia para insertar segmentos V humanos adicionales dando como resultado 40 segmentos V, 2 segmentos D y 14 segmentos J humanos; y la **Fig. 8E** representa la estrategia para la inserción de segmentos V adicionales humanos dando como resultado 66 segmentos V, 2 segmentos D y 14 segmentos J humanos; La **Fig. 8F** representa la sustitución del segmento V de ratón de un potenciador de ratón, dando como resultado 67 segmentos V, 2 segmentos D y 14 segmentos J humanos. En esta realización particular, un segmento V de ratón se retiene en 5' de los genes del tripsinógeno de ratón.

La **Fig. 9** representa los histogramas de un análisis FACS representativo para el porcentaje de células esplénicas (donde el eje Y es el número de células, el eje X es la intensidad promedio de fluorescencia, y la clasificación muestra la frecuencia de linfocitos T CD3+ en la población de linfocitos únicos) teñida con anticuerpo dirigido contra CD3 en un ratón silvestre (WT); un ratón homocigótico para un locus TCR α eliminado (primer panel superior; MAID 1540 de la Fig. 3); un ratón homocigótico para un locus TCR α eliminado y que comprende 8 segmentos V α y 61 segmentos J α humanos (segundo panel superior; MAID 1767 de la Fig. 3 o un TCR α humanizado de ratón); un ratón homocigótico para un locus TCR β eliminado con la excepción de uno en la dirección 5' y uno en la dirección 3' de los fragmentos V β de ratón (primer panel inferior; MAID 1545 de la Fig. 7); un ratón homocigótico para un locus TCR β eliminado con segmentos con unos segmentos V β de ratón en la dirección 5' y unos segmentos V β de ratón en la dirección 3' y comprendiendo 14 segmentos V β humanos, 2 segmentos D β , y 14 segmentos J β humanos (segundo panel inferior; MAID 1716 de la Fig. 7 o un ratón TCR β humanizado); y un ratón homocigótico para las delecciones de loci TCR α y TCR β (con la excepción de dichos dos segmentos V β de ratón) y que comprende 8 segmentos V α y 61 segmentos J α humanos en el locus TCR α endógeno así como 14 segmentos V β , 2 segmentos D β , y 14 segmentos J β humanos en los loci TCR β endógenos (MAID 1767/1716 o un TCR α / β humanizado de ratón).

La **Fig. 10** es un gráfico envolvente de FACS representativo de timocitos de ratón de un ratón silvestre, un ratón TCR α humanizado homocigótico (1767 HO, hTCR α); un ratón TCR β humanizado homocigótico (1716 HO; hTCR β); y un ratón TCR α / β humanizado homocigótico (1716 HO 1767 HO; hTCR α / β) teñido con anticuerpos dirigidos contra CD4 (eje Y) y anticuerpos dirigidos contra CD8 (eje X) (panel superior), y anticuerpos dirigidos contra CD44 (eje Y) y anticuerpos dirigidos contra CD25 (eje X) (panel inferior). El gráfico FACS en el panel superior permite distinguir linfocitos T doble negativo (DN), doble positivo (DP), CD4 simple positivo (CD4 SP), y CD8 simple positivo (SP CD8). El gráfico FACS en el panel inferior permite distinguir diversas etapas de linfocitos T doble negativo durante el desarrollo de los linfocitos T (DN1, DN2, DN3 y DN4). 1716 y 1767 se refieren a números MAID como se identifica en las Figs. 3 y 7.

La **Fig. 11** demuestra cualquier frecuencia (panel superior) o número absoluto (panel inferior) de linfocitos T DN, DP, CD4 SP, y CD SP en el timo de cualquier ratón silvestre, hTCR α (1767 HO); hTCR β (1716 HO); o hTCR α / β (1716 HO 1767 HO) (n=4).

La **Fig. 12** es un análisis FACS representativo de los esplénocitos de un ratón silvestre, hTCR α (1767 HO); hTCR β (1716 HO); o hTCR α / β (1716 HO 1767 HO); el panel izquierdo representa el análisis de células singletes basado

en la tinción de anticuerpos dirigidos contra CD19 (eje Y; tinción de linfocitos B) o la tinción de anticuerpos dirigidos contra CD3 (eje X; tinción de linfocitos T); el panel intermedio representa el análisis de linfocitos CD3+ basado en la tinción de anticuerpos dirigidos contra CD4 (eje Y) o la tinción de anticuerpos dirigidos contra CD8 (eje X); y el panel derecho representa el análisis tanto de células CD4+ como células CD8+ basado en la tinción de anticuerpos dirigidos contra CD44 (eje Y) o la tinción de anticuerpos dirigidos contra CD62L (eje X), las tinciones permiten distinguir diversos tipos de linfocitos T en la periferia (linfocitos T no expuestos anteriormente a tratamiento frente a linfocitos T con memoria central (Tcm) frente a linfocitos T con memoria efectora o efectores (Teff/Tem)).

La **Fig. 13** demuestra el número de linfocitos T CD4+ (panel izquierdo) o CD8+ (panel derecho) por bazo(ejes Y) de ratones silvestres, hTCR α (1767 HO); hTCR β (1716 HO); o hTCR α/β (1716 HO 1767 HO) (n=4).

La **Fig. 14** demuestra el número de linfocitos T no expuestos a tratamiento anteriormente, linfocitos Tcm, y Teff/em por bazo (ejes Y) de linfocitos T CD4+ (panel superior) o linfocitos T CD8+ (panel inferior) de ratones silvestres, hTCR α (1767 HO); hTCR β (1716 HO); o hTCR α/β (1716 HO 1767 HO) (n=4).

La **Fig. 15** son tablas que resumen la expresión (determinada por el análisis FACS utilizando anticuerpos variables específicos de segmentos) de diversos segmentos TCR β V en los linfocitos T CD8+ esplénicos (**Fig. 15A**) o linfocitos T CD4+ (**Fig. 15B**) de ratones silvestres, hTCR β (1716 HO) o hTCR α/β (1716 HO 1767 HO). Los datos se presentan como Promedio $\pm$ SD (n=4 ratones por grupo)

La **Fig. 16** representa el ARNm de expresión (ejes Y) de varios segmentos TCR β V humanos presentes en ratones silvestres, hTCR α (1767 HO); hTCR β (1716 HO); o hTCR α/β (1716 HO 1767 HO) en linfocitos T tímicos o esplénicos; La Fig. 16A representa el análisis de expresión del ARNm del segmento variable TCR β humano (hTRBV) 18, 19, 20, y 24; y la Fig. 16B representa el análisis de expresión de ARNm de hTRBV 25, 27, 28, y 29.

La **Fig. 17** representa histogramas FACS representativos de esplenocitos (donde el eje Y es el número de células, el eje X es la intensidad de la fluorescencia promedio, y la clasificación muestra la frecuencia de linfocitos T CD3+ en la población de linfocitos únicos) teñida con anticuerpos dirigidos contra CD3 en un ratón silvestre, un ratón homocigótico para un locus TCR α eliminado (TCRA Δ V), un ratón homocigótico para el locus TCR α eliminado con 2 segmentos V humanos y 61 segmentos J humanos (TCRA 2 hV; MAID 1626 de la Fig. 3), un ratón homocigótico para el locus TCR α eliminado con 8 segmentos V humanos y 61 segmentos J humanos (TCRA 8 hV; MAID 1767 de la Fig. 3), y un ratón homocigótico para el locus TCR α eliminado con 23 segmento V humanos y 61 segmentos J humanos (TCRA 23 hV; MAID 1979 de la Fig. 3).

La **Fig. 18**, en el panel superior izquierdo, es un análisis FACS representativo de linfocitos T CD3+ del timo obtenido tanto de un ratón silvestre como de un ratón homocigótico hTCR α con 23 segmentos V y 61 segmentos J humanos (1979 HO) teñidos tanto con anticuerpo dirigido contra CD4 (eje Y) como con anticuerpo dirigido contra CD8 (eje X); en el panel inferior izquierdo, es un análisis FACS de linfocitos T DN tanto como de uno cualquiera de un ratón silvestre como de 1979 teñido tanto con anticuerpo dirigido contra CD44 (eje Y) como anticuerpo dirigido contra CD25 (eje X); en el panel de la derecha son gráficos del porcentaje de timocitos (eje Y) que son DN, DP, CD4 SP, o CD8 SP tanto como de uno cualquiera de ratones silvestres como de ratones 1979 HO (n=4).

La **Fig. 19**, en el panel izquierdo, es un análisis FACS representativo de linfocitos esplénicos de un ratón silvestre o 1979 HO teñido tanto con anticuerpos dirigidos contra CD19 como con anticuerpos dirigidos contra CD3; en el panel derecho, son gráficos del porcentaje de esplenocitos obtenidos de ratones silvestres y ratones 1979 HO (n=4) que son CD3+.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

La presente invención divulga animales no humanos genéticamente modificados, por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratones o ratas, que expresan receptores de linfocitos T humanizados. La presente invención se refiere también a animales no humanos genéticamente modificados que comprenden en su línea germinal loci de genes variables de receptores de linfocitos T sin reorganizar. También se divulgan embriones, células y tejidos que comprenden los mismos; métodos para producir los mismos; así como métodos para usar los mismos. Salvo que se defina de otro modo, todos los términos y frases utilizadas en el presente documento incluyen que los términos y las frases que son habituales en la técnica, salvo que se indique claramente lo contrario o sea claramente evidente a partir del contexto en el que se usa un término o frase.

El término "conservativo", cuando se usa para describir una sustitución conservativa de aminoácido, incluye la sustitución de un resto de aminoácido por otro resto de aminoácido que tiene un grupo R de la cadena secundaria con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). Se pueden conseguir sustituciones conservativas de aminoácidos modificando una secuencia de nucleótidos con el fin de introducir un cambio de nucleótidos que codificará la sustitución conservativa. En general, una sustitución conservativa de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de interés de una proteína, por ejemplo, la capacidad de un

linfocito T de reconocer un péptido presentado por una molécula de MHC. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas secundarias con propiedades químicas similares incluyen cadenas secundarias alifáticas tales como glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; cadenas secundarias hidroxil alifáticas tales como serina y treonina; cadenas secundarias que contienen amida tales como asparagina y glutamina; cadenas secundarias aromáticas tales como fenilalanina, tirosina y triptófano; cadenas secundarias básicas tales como lisina, arginina e histidina; cadenas secundarias ácidas tales como ácido aspártico y ácido glutámico; y, cadenas secundarias que contienen azufre tales como cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservativos incluyen, por ejemplo, valina/leucina/isoleucina, fenilalanina/arginina, lisina/arginina, alanina/valina, glutamato/aspartato, y asparagina/glutamina. En algunas realizaciones, una sustitución de aminoácidos conservativa puede ser una sustitución de cualquier resto nativo en una proteína con alanina, como se usa en, por ejemplo, mutagénesis de barrido de alanina. En algunas realizaciones, se realiza una sustitución conservativa que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica de PAM250 divulgada en Gonnet et al. ((1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256:1443-45). En algunas realizaciones, la sustitución es una sustitución moderadamente conservativa en la que la sustitución tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica de PAM250.

Por tanto, se divulga en el presente documento un animal no humano genéticamente modificado que expresa polipéptidos TCR α y polipéptidos β humanizados (y/o polipéptidos TCR δ y TCR γ humanizados) que comprenden sustituciones de aminoácidos conservativas en la secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento.

Un experto en la materia entenderá que en la adición a los restos de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos TCR α y β humanizados descritos en el presente documento, debido a la degeneración del código genético, otros ácidos nucleicos pueden codificar los polipéptidos de la invención. Por lo tanto, además de un animal no humano genéticamente modificado que comprende en su genoma secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos TCR humanizados descritos en el presente documento, se divulga también un animal no humano que comprende en su genoma secuencias de nucleótidos que difieren de las descritas en el presente documento debido a la degeneración del código genético.

El término "identidad", cuando se usa junto con secuencia incluye identidad, como se determina mediante numerosos algoritmos diferentes conocidos en la técnica que se pueden usar para medir la identidad de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, se determinan las identidades usando un alineamiento ClustalW v. 1.83 (lento) que emplea una penalización por apertura de hueco de 10,0, una penalización por extensión de hueco de 0,1, y que utiliza una matriz de similitud de Gonnet (MacVector™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008). La longitud de las secuencias comparadas con respecto a la identidad de las secuencias dependerá de las secuencias concretas. En diversas realizaciones, la identidad se determina comparando la secuencia de una proteína madura desde su extremo N a su extremo C. En diversas realizaciones, cuando se compara una secuencia humana/no humana quimérica con una secuencia humana, la parte humana de la secuencia humana/no humana quimérica (pero no la parte no humana) se usa en la preparación de una comparación con el fin de discernir un nivel de identidad entre una secuencia humana y una parte humana de una secuencia humana/no humana quimérica (por ejemplo, comparando un ectodominio humano de una proteína humana/de ratón quimérica con un ectodominio humano de una proteína humana).

Los términos "homología" u "homólogo" en referencia a las secuencias, por ejemplo, nucleótidos o secuencias de aminoácidos, significan dos secuencias que, tras el alineamiento y la comparación óptimos, son idénticos en al menos aproximadamente 75% de nucleótidos o aminoácidos, al menos aproximadamente 80% de nucleótidos o aminoácidos, al menos aproximadamente 90-95% de nucleótidos o aminoácidos, por ejemplo, más de 97% de nucleótidos o aminoácidos. Un experto en la materia entenderá que, para el direccionamiento óptimo del gen, la construcción directora debe contener brazos homólogos a secuencias de ADN endógenas (es decir, "brazos de homología"); por lo tanto, se puede producir la recombinación homóloga entre la construcción de direccionamiento y la secuencia endógena dirigida.

El término "unido operativamente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos de esta manera están en una relación que les permite funcionar en su manera prevista. Por tanto, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína puede unirse operativamente a secuencias reguladoras (por ejemplo, promotoras, potenciadoras, secuencia silenciadora, etc.) con el fin de retener la regulación de la transcripción adecuada. Además, varias partes de la proteína humanizada de la invención pueden unirse operativamente para retener el plegado, procesamiento, dirección, expresión adecuados y otras propiedades funcionales de la proteína en la célula. A menos que se indique otra cosa, varios dominios de la proteína humanizada de la invención se unen operativamente entre sí.

El término "sustitución", en referencia a la sustitución de genes se refiere a colocar material genético exógeno en un locus genético endógeno, sustituyendo por tanto todo o una parte del gen endógeno con una secuencia de ácido nucleico ortóloga u homóloga. En un caso, un gen no humano endógeno o fragmento del mismo se sustituye con un gen humano correspondiente o el fragmento del mismo. Un gen humano correspondiente o fragmento del mismo es un gen o fragmento humano que es un ortólogo de, un homólogo de, o es sustancialmente idéntico o el mismo en estructura y/o función, que el gen no humano endógeno o fragmento del mismo que se sustituye. Como se demuestra en los Ejemplos siguientes, las secuencias de nucleótidos de los loci endógenos de genes TCR α y β variables no

humanos se sustituyeron por secuencias de nucleótidos que correspondía a los loci de genes TCR α y β variables humanos.

"Funcional" como se usa en el presente documento, por ejemplo, en referencia a una proteína funcional, se refiere a una proteína que retiene al menos una actividad biológica normalmente asociada con la proteína nativa. Por ejemplo, En algunas realizaciones de la invención, una sustitución en un locus endógeno (por ejemplo, la sustitución en los loci de genes TCR α , TCR β , TCR δ y/o TCR γ variables no humanos endógenos) da como resultado un locus que fracasa en expresar una proteína endógena funcional.

Un locus TCR o locus de gen TCR (por ejemplo, locus TCR α o locus TCR β), como se usa en el presente documento, se refiere al ADN genómico que comprende la región de codificación de TCR, incluyendo la región de codificación de TCR completa, incluyendo las secuencias V(D)J sin reorganizar, potenciadoras, la secuencia, secuencia(s) constante(s) y cualquier región reguladora en la dirección 5' o en la dirección 3' (UTR, etc.), o secuencia de ADN interviniente (intrones, etc.). Un locus variable TCR o locus de gen TCR variable (por ejemplo, locus del gen TCR α variable o locus del gen TCR β variable), se refiere a ADN genómico que comprende la región que incluye segmentos de la región TCR variable (región V(D)J) pero excluye las secuencias constantes de TCR y, en diversas realizaciones, secuencias potenciadoras. Se pueden incluir otras secuencias en el locus del gen TCR variable a fines de manipulación genética (por ejemplo, casetes de selección, sitios de restricción, etc.) y estos están abarcados en el presente documento.

Animales TCR genéticamente modificados

En diversos ejemplos, la invención divulga generalmente animales no humanos genéticamente modificados en los que los animales no humanos comprenden en el genoma loci de genes variables TCR humanizados sin reorganizar.

Los epítomos se unen a linfocitos T sobre pequeños determinantes antigénicos sobre la superficie de células presentadoras de antígenos que se asocian con un complejo de histocompatibilidad mayor (MHC; en ratones) o complejo de antígenos de leucocitos humanos (HLA; en seres humanos). Los linfocitos T se unen a estos epítomos mediante un complejo receptor de linfocitos T (TCR) sobre la superficie del linfocito T. Los receptores de linfocitos T son estructuras heterodiméricas compuestas por dos tipos de cadenas: una cadena α (alfa) y β (beta) y una cadena δ (delta). La cadena α está codificada por la secuencia de ácido nucleico localizada en el locus α (en el cromosoma 14 humano o de ratón) que abarca también el locus δ completo, y la cadena β está codificada por la secuencia de ácido nucleico localizada en el locus β (en el cromosoma 6 de ratón o el cromosoma 7 humano). La mayoría de los linfocitos T tienen un TCR $\alpha\beta$; mientras que la minoría de linfocitos T soporta un TCR $\gamma\delta$. En la Fig. 1 se muestran las interacciones de los TCR con moléculas MHC de clase I (presentación a linfocitos T CD8+) y MHC de clase II (presentación a linfocitos T CD4+) (los símbolos cerrados representan secuencias no humanas; los símbolos abiertos representan secuencias humanas, que muestran una realización concreta de la proteína TCR de la presente invención).

Los receptores de linfocitos T y los polipéptidos α y β (y de forma similar, los polipéptidos γ y δ) se unen entre sí mediante un enlace disulfuro. Cada uno de los dos polipéptidos que componen la TCR contiene un dominio extracelular que comprende regiones constantes y variables, un dominio transmembrana, y una cola citoplásmica (el dominio transmembrana y la cola citoplásmica son también una parte de la región constante). La región variable de TCR determina su especificidad antigénica, y de forma similar a las inmunoglobulinas, comprende 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR). De forma similar también a los genes de la inmunoglobulina, los loci de genes variables receptores de linfocitos T (por ejemplo, los loci TCR α y TCR β) contienen numerosos segmentos V(D)J sin reorganizar (segmentos variables (V), de unión (J), y en TCR β y δ , segmentos de diversidad (D)). Durante el desarrollo de linfocitos T en el timo, el locus del gen TCR α variable experimenta una reorganización, de tal manera que la cadena TCR α resultante está codificada por una combinación específica de segmentos VJ (secuencia Va/J α); y el locus del gen TCR β variable experimenta una reorganización, de tal manera que la cadena TCR β resultante está codificada por una combinación específica de segmentos VDJ (secuencia V β /D β /J β).

Las interacciones con estroma tímico estimulan timocitos que experimentan diversas etapas de desarrollo, caracterizadas por la expresión de diversos marcadores superficiales celulares. En la Tabla 1 se presenta un resumen de marcadores superficiales celulares característicos en varias etapas de desarrollo en el timo. La reorganización en el locus del gen TCR β variable comienza en la etapa DN2 y finaliza durante la etapa DN4, mientras que la reorganización en el locus del gen TCR α variable se produce en la etapa DP. tras la finalización de la reorganización del locus TCR β , las células expresan la cadena de TCR β en la superficie celular junto con la cadena α sustituta, pT α . Véase, Janeway's Immunobiology, Capítulo 7, anteriormente citado.

Tabla 1: Etapas de desarrollo de los linfocitos T en el timo

Etapas de desarrollo	DN1	DN2	DN3	DN4	DP	SP
Marcador(es)	CD44+/CD25-	CD44+/CD25+	CD44 ^{bajo} /CD25+	CD44-/CD25-	CD4+/CD8+	CD4+ o CD8+

Los linfocitos T CD4+ y CD8+ no expuestos a tratamiento anteriormente salen del timo y penetran en los órganos linfoides periféricos (por ejemplo, bazo) donde se exponen a antígenos y se activan para expandirse por clonación y diferenciarse en numerosos linfocitos T efectores (Teff), por ejemplo, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T_{REG}, linfocitos T_H17, linfocitos T_H1, linfocitos T_H2, etc. De forma posterior a la infección, numerosos linfocitos T persisten como linfocitos T con memoria, y se clasifican tanto como linfocitos T con memoria central (Tcm) o linfocitos T con memoria efectora (Tcm). Sallusto et al. (1999) Dos subconjuntos de linfocitos T con memoria con distintos potenciales de guiado y funciones efectoras, Nature 401:708-12 y el Commentary de Mackay (1999) Dual personality of memory T cells, Nature 401:659-60. Sallusto y sus colaboradores propusieron que, tras la infección inicial, los linfocitos Tcm representan un combinado fácilmente disponible de linfocitos T con memoria cebados con antígenos en los tejidos periféricos con funciones efectoras, aunque los linfocitos Tcm representan linfocitos T con memoria cebados con antígenos en los órganos linfoides periféricos que tras un estímulo secundario pueden llegar a ser nuevos linfocitos T efectores. Aunque todos los linfocitos T con memoria expresan la isoforma CD45RO de CD45 (los linfocitos T no expuestos anteriormente a tratamiento expresan la isoforma CD45RA), los Tcm se caracterizan por la expresión de la L-selectina (conocida también como CD62L) y CCR7+, que son importantes para la unión y la señalización en los órganos linfoides y en los ganglios linfáticos. *Id.* Por tanto, todos los linfocitos T que se encuentran en los órganos linfoides periféricos (por ejemplo, linfocitos T no expuestos anteriormente a tratamiento, linfocitos Tcm, etc.) expresan CD62L. Además de CD45RO, todos los linfocitos T con memoria se sabe que expresan numerosos marcadores superficiales celulares diferentes, por ejemplo, CD44. Para resumir los diversos marcadores superficiales en linfocitos T, véase Janeway's Immunobiology, Capítulo 10, anteriormente citado.

Aunque el dominio TCR variable funciona principalmente en el reconocimiento de antígenos, la parte extracelular del dominio constante, así como los dominios transmembrana, y citoplásmico de TCR sirven también importantes funciones. Un complejo receptor de TCR completo requiere más de los polipéptidos α y β o γ y δ ; las moléculas adicionales requeridas incluyen CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ , así como el homodímero de la cadena ζ ($\zeta\zeta$). Tras la finalización de la reorganización de TCR β , cuando las células expresan TCR β /pT α , este complejo pre-TCR existe junto con CD3 sobre la superficie celular. TCR α (o pT α) sobre la superficie celular tiene dos restos básicos en su dominio transmembrana, uno de los cuales recluta un heterodímero CD3 $\gamma\epsilon$, y otro recluta $\zeta\zeta$ mediante sus respectivos restos ácidos. TCR β tiene un resto básico adicional en su dominio transmembrana que se cree que recluta el heterodímero CD3 $\delta\epsilon$. Véase, *por ejemplo*, Kuhns et al. (2006) Deconstructing the Form and Function of the TCR/CD3 Complex, Immunity 24:133-39; Wucherpfennig et al. (2009) Structural Biology of the T-cell Receptor: Insights into Receptor Assembly, Ligand Recognition, and Initiation of Signaling, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2:a005140. El complejo ensamblado, que comprende el heterodímero TCR $\alpha\beta$, CD3 $\gamma\epsilon$, CD3 $\delta\epsilon$, y $\zeta\zeta$, se expresa en la superficie de los linfocitos T. Se han sugerido restos polares en el dominio transmembrana para servir como control de calidad para salir del retículo endoplásmico; se ha demostrado que en la ausencia de las subunidades CD3, las cadenas TCR se retienen en el RE y son dirigidas para la degradación. Véase, *por ejemplo*, Call y Wucherpfennig (2005) The T Cell Receptor: Critical Role of the Membrane Environment in Receptor Assembly and Function, Annu. Rev. Immunol. 23:101-25.

Las cadenas CD3 y ζ del complejo ensamblado proporcionan componentes para la señalización de TCR como el heterodímero TCR $\alpha\beta$ (o heterodímero TCR $\gamma\delta$) que por sí mismo carece de actividad transductora de la señalización. Las cadenas CD3 poseen cada una un Motivo de activación basado en la tirosina del inmunorreceptor, mientras que la cadena ζ contiene tres ITAM en tándem. Los ITAM contienen restos de tirosina capaces de fosforilarse por las quinasas asociadas. Por tanto, el complejo TCR-CD3 ensamblado contiene 10 motivos ITAM. Véase, *por ejemplo*, Love y Hayes (2010) ITAM-Mediated Signaling by the T-Cell Antigen Receptor, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2:e002485. Tras el acoplamiento de TCR, los motivos ITAM están fosforilados por las tirosina quinasas de la familia Src, Lck y Fyn, que inicia una cascada de señalización, dando como resultado la activación de Ras, la movilización del calcio, las reorganizaciones del citoesqueleto de la actina, y la activación de los factores de transcripción, conduciendo todas en última instancia a la diferenciación de los linfocitos T, la proliferación, y acciones efectoras. *Id.*, véase también, Janeway's Immunobiology, 7ª Ed., Murphy et al. eds., Garland Science, 2008.

Adicionalmente, se piensa que los dominios transmembrana y citoplásmicos de TCR β tienen un papel en el direccionamiento mitocondrial y la inducción de la apoptosis; de hecho, las moléculas TCR β truncadas en el extremo N que se producen naturalmente existen en los timocitos. Shani et al. (2009) Incomplete T-cell receptor- β peptides target the mitochondrion and induce apoptosis, Blood 113:3530-41. Por tanto, algunas funciones importantes están servidas por la región constante de TCR (que, en diversas realizaciones, comprende una parte de dominios extracelulares así como transmembrana y citoplásmicos); y en diversas realizaciones, debe tomarse en consideración la estructura de esta región cuando se diseñan animales no humanos modificados genéticamente o TCR humanizados que expresan lo mismo.

Se conocen en la técnica ratones transgénicos para las secuencias receptoras de linfocitos T reorganizadas. La presente invención divulga animales no humanos genéticamente modificados, por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratas, ratones que comprenden loci de genes variables que comprenden loci de genes variables de linfocitos T humanos o humanizados reorganizados que son capaces de reorganizarse para formar secuencias de ácido nucleico que codifican dominios variables receptores de linfocitos T humanos, incluyendo animales que comprenden linfocitos T que comprenden dominios variables humanos reorganizados y regiones constantes no humanas (por ejemplo, de ratón o de rata). La presente invención divulga también animales no humanos (por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratas, ratones) que son capaces de generar un repertorio diverso de secuencias variables receptoras de linfocitos T

humanos; por lo tanto, la presente invención divulga animales no humanos que expresan TCR con dominios variables completamente humanos en respuesta a un antígeno de interés y que se unen a un epítipo del antígeno de interés. En algunos ejemplos, se divulgan animales no humanos que generan un repertorio diverso de receptores de linfocitos T capaces de reaccionar con diversos antígenos, incluyendo, aunque no de forma limitativa, antígenos presentados por APC.

En un ejemplo, se divulgan en el presente documento animales no humanos genéticamente modificados, por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratas, ratones que comprenden en su genoma segmentos de la región TCR variable humana sin reorganizar (segmentos (V(D)J), en la que los segmentos de la región TCR variable humana sin reorganizar sustituyen, en un locus endógeno de gen TCR variable no humano (por ejemplo, de roedor) (por ejemplo, un locus de gen TCR α variable, β , δ , y/o γ), segmentos de la región TCR variable no humana endógena. En un ejemplo, el locus del gen TCR variable humano sin reorganizar sustituye el locus de gen TCR variable endógeno no humano.

En otro ejemplo, la invención divulga animales no humanos genéticamente modificados, por ejemplo, roedores (por ejemplo, ratas, ratones) que comprenden en su genoma segmentos de la región TCR variable humana sin reorganizar (segmentos (V(D)J), en el que los segmentos de la región TCR variable humana sin reorganizar están unidos operativamente a una secuencia génica de la región TCR constante no humana para formar un locus TCR humanizado, en el que el locus TCR humanizado está en un sitio en el genoma diferente del locus TCR endógeno no humano. Por tanto, en un ejemplo, se divulga también un animal no humano (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, ratón, rata) que comprende un transgén que comprende segmentos de la región TCR variable humana sin reorganizar unidos operativamente a la secuencia de la región TCR constante no humana.

En un aspecto, las células de roedor aisladas modificadas genéticamente de la invención comprenden en su genoma segmentos de la región variable TCR humana, pero reteniendo los segmentos génicos constantes de TCR de roedor (por ejemplo, ratón, rata). En diversos ejemplos, las regiones constantes incluyen un dominio transmembrana y la cola citoplásmica de TCR. Por tanto, en diversos ejemplos divulgados en el presente documento, los animales no humanos genéticamente modificados retienen el dominio transmembrana TCR no humano endógeno y la cola citoplásmica. En otros ejemplos, los animales no humanos comprenden secuencias génicas constantes TCR no endógenas no humanas, por ejemplo, un dominio transmembrana TCR no endógeno no humano y la cola citoplásmica. Tal como se ha indicado anteriormente, la región TCR constante participa en la cascada de señalización iniciada durante la activación de los linfocitos T cebados con antígenos; por lo tanto, la región TCR constante endógena interactúa con varias proteínas de anclaje no humanas y señalización de roedor en los linfocitos T. Por tanto, en un ejemplo, los animales no humanos modificados genéticamente divulgados en el presente documento expresan receptores de linfocitos T humanizados que retienen la capacidad de reclutar varias moléculas de anclaje o señalización no humanas endógenas, por ejemplo, moléculas CD3 (por ejemplo, CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ), la cadena ζ , Lck, Fyn, ZAP-70, etc. Se describe una lista no limitante de moléculas que se reclutan para el complejo TCR en Janeway's Immunobiology, anteriormente citado. Además, de forma similar a los ratones VELOCIMMUNE®, que presentan un desarrollo normal de linfocitos B y procesos de selección por clonación normales que se cree que es debido al menos en parte a la colocación de regiones variables en los loci endógenos de ratón y el mantenimiento de dominios constantes de ratón, en un ejemplo, los animales no humanos divulgados en el presente documento presentan procesos de desarrollo de linfocitos T y diferenciación de linfocitos T normales.

En algunos ejemplos, se divulga un animal no humano que comprende en su genoma segmentos de la región TCR α variable humana sin reorganizar, en el que los segmentos de la región TCR α variable humana sin reorganizar están unidos operativamente a una secuencia de un gen de la región TCR α constante no humano para formar un locus TCR α humanizado. En un ejemplo, el locus TCR α humanizado está en un sitio en el genoma diferente del locus endógeno TCR α no humano. En otro ejemplo, los segmentos de la región TCR α variable humana sin reorganizar sustituyen segmentos de la región TCR α variable endógena no humana reteniendo a la vez la región constante TCR α endógena no humana. En un ejemplo, el locus del gen TCR α variable humano sin reorganizar sustituye el locus del gen TCR α variable endógeno no humano. En algunos ejemplos, el animal retiene las secuencias de la región TCR β variable endógena no humana y las secuencias génicas de la región constante. Por tanto, el animal comprende un TCR que comprende una cadena TCR α humana/no humana (es decir, humanizada) quimérica y una cadena TCR β no humana.

En otros ejemplos, se divulga un animal no humano que comprende en su genoma segmentos de la región TCR β variable humana sin reorganizar, en el que los segmentos de la región TCR β variable humana sin reorganizar están unidos operativamente a una secuencia génica de la región TCR β constante no humana dando como resultado un locus TCR β humanizado. En un ejemplo, el locus TCR β humanizado está en un sitio en el genoma diferente del locus TCR β endógeno no humano. En otro ejemplo, los segmentos de la región TCR β variable humana sin reorganizar sustituyen los segmentos de la región TCR β variable endógena no humana reteniendo a la vez la región TCR β constante endógena no humana. En un ejemplo, el locus del gen TCR β variable humano sin reorganizar sustituye el locus del gen TCR β variable endógeno no humano. En algunos ejemplos, el animal retiene las secuencias de la región TCR α variable endógena no humana y las secuencias génicas de la región constante. Por tanto, el animal expresa un TCR que comprende una cadena TCR β humana/no humana (es decir, humanizada) quimérica y una cadena TCR α no humana.

En algunos ejemplos específicos, la invención divulga un animal no humano genéticamente modificado, por ejemplo, un roedor (por ejemplo, un ratón o rata) que comprende en su genoma (a) un locus de gen variable α de un receptor de linfocitos T sin reorganizar (TCR) que comprende al menos un segmento $V\alpha$ humano y al menos un segmento $J\alpha$ humano, unido operativamente a un roedor endógeno, por ejemplo, secuencias génicas constantes de TCR α no humanas (por ejemplo, de roedor, por ejemplo, de ratón o rata), y/o (b) un locus de un gen TCR β variable sin reorganizar que comprende al menos un segmento $V\beta$ humano, al menos un segmento $D\beta$ humano, y al menos un segmento $J\beta$ humano, unido operativamente a un roedor endógeno, por ejemplo, una secuencia génica constante de TCR β no humana (por ejemplo, de roedor, por ejemplo, de ratón o rata).

En diversos ejemplos de la invención, el locus del gen TCR variable humano o humanizado sin reorganizar (por ejemplo, el locus del gen TCR α y/o TCR β variable) está comprendido en la línea germinal del animal no humano (por ejemplo, roedor, por ejemplo, ratón o rata). En diversos ejemplos, las sustituciones de los segmentos V(D)J de TCR por segmentos V(D)J de TCR humano sin reorganizar (por ejemplo, segmentos $V\alpha$ y $J\alpha$, y/o $V\beta$ y $D\beta$ y $J\beta$) están en un locus (o loci) TCR variable endógeno no humano, en el que los segmentos V y J y/o V y D y J humanos sin reorganizar están unidos operativamente a genes de la región TCR constante no humanos.

En algunos ejemplos divulgados en el presente documento, el animal no humano comprende dos copias del locus del gen TCR α variable humano o humanizado sin reorganizar y/o dos copias del locus del gen TCR β variable humano o humanizado sin reorganizar. Por tanto, el animal no humano es homocigótico para uno o ambos locus del gen TCR α y TCR β variable humano o humanizado sin reorganizar. En algunos ejemplos divulgados en el presente documento, el animal no humano comprende una copia del locus del gen TCR α variable humano o humanizado sin reorganizar y/o una copia del locus del gen TCR β variable humano o humanizado sin reorganizar. Por tanto, el animal no humano es heterocigótico para uno o ambos locus del gen TCR α y TCR β variable humano o humanizado sin reorganizar.

En un ejemplo, el locus del gen TCR α variable sin reorganizar que comprende segmentos de la región variable humana (por ejemplo, segmentos $V\alpha$ y $J\alpha$ humanos) se sitúa en el genoma no humano de tal manera que los segmentos de la región variable humana sustituyen los segmentos de la región variable no humana correspondientes. En un ejemplo, el locus del gen TCR α variable sin reorganizar que comprende los segmentos de la región variable humana sustituye el locus endógeno del gen TCR α variable. En un ejemplo, los segmentos $V\alpha$ y $J\alpha$ endógenos no humanos son incapaces de reorganizarse para formar una secuencia $V\alpha/J\alpha$ reorganizada. Por tanto, en un ejemplo, los segmentos $V\alpha$ y $J\alpha$ humanos en el locus del gen TCR α variable sin reorganizar son capaces de reorganizarse para formar una secuencia $V\alpha/J\alpha$ humana sin reorganizar.

De manera similar, en un ejemplo, el locus del gen TCR β variable sin reorganizar que comprende segmentos de la región variable humana (por ejemplo, segmentos $V\beta$, $D\beta$, y $J\beta$ humanos) se sitúa en el genoma no humano de tal manera que los segmentos de la región variable humana sustituyen los segmentos de la región variable no humana correspondientes. En un ejemplo, el locus del gen TCR β variable sin reorganizar comprende segmentos de la región variable humana sustituye el locus endógeno del gen TCR β variable. En un ejemplo, los segmentos $V\beta$, $D\beta$, y $J\beta$ endógenos no humanos son incapaces de reorganizarse para formar una secuencia $V\beta/D\beta/J\beta$ reorganizada. Por tanto, en un ejemplo, los segmentos $V\beta$, $D\beta$, y $J\beta$ en el locus del gen TCR β variable sin reorganizar son capaces de reorganizarse para formar una secuencia $V\beta/D\beta/J\beta$ humana reorganizada.

En otro ejemplo más, los loci del gen TCR α y β variables sin reorganizar que comprende los segmentos de la región variable humana sustituyen los loci endógenos del gen TCR α y β variables. En un ejemplo, los segmentos $V\alpha$ y $J\alpha$ no humanos endógenos son incapaces de reorganizarse para formar una secuencia $V\alpha/J\alpha$ reorganizada, y los segmentos $V\beta$, $D\beta$, y $J\beta$ no humanos endógenos son incapaces de reorganizarse para formar una secuencia $V\beta/D\beta/J\beta$ reorganizada. Por tanto, en un ejemplo, los segmentos $V\alpha$ y $J\alpha$ humanos en el locus del gen TCR α variable sin reorganizar son capaces de reorganizarse para formar una secuencia $V\alpha/J\alpha$ humana sin reorganizar y los segmentos $V\beta$, $D\beta$, y $J\beta$ humanos en el locus del gen TCR β variable sin reorganizar son capaces de reorganizarse para formar una secuencia $V\beta/D\beta/J\beta$ humana sin reorganizar.

En algunos ejemplos, el animal no humano que comprende un locus del gen TCR α y/o TCR β humanizado (que comprende un locus del gen TCR α y/o TCR β variable) retiene un locus endógeno del gen TCR α y/o TCR β variable no humano. En un ejemplo, el locus del gen TCR α variable y/o TCR β endógeno no humano es un locus no funcional. En un ejemplo, el locus no funcional es un locus inactivado, por ejemplo, un locus invertido (por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico codificante del locus del gen variable está en orientación invertida con respecto a la secuencia de la región constante, de tal manera que no son posibles reorganizaciones satisfactorias utilizando segmentos de la región variable procedentes del locus invertido). En un ejemplo, el locus del gen TCR α y/o TCR β variable humanizado se sitúa entre el locus del gen TCR α y/o TCR β variable endógeno no humano y el locus del gen TCR α y/o TCR β constante endógeno no humano.

El número, nomenclatura, posición, así como otros aspectos de los segmentos V y J y/o V, D, y J de los loci TCR humano y de ratón pueden dilucidarse utilizando la base de datos IMGT, disponible en www.imgt.org. El locus TCR α variable de ratón tiene aproximadamente 1,5 megabases y comprende un total de 110 segmentos $V\alpha$ y 60 segmentos $J\alpha$ (Fig. 2). El locus TCR α variable humano tiene aproximadamente 1 megabase y comprende un total de 54 segmentos $V\alpha$ y 61 segmentos $J\alpha$, creyéndose que 45 $V\alpha$ y 50 $J\alpha$ son funcionales. A menos que se indique otra cosa,

los números de los segmentos V(D)J humanos a los que se hace referencia en la totalidad de la memoria descriptiva se refieren al número total de segmentos V(D)J. En un ejemplo, el animal no humano modificado genéticamente, por ejemplo, roedor, por ejemplo, ratón o rata, comprende al menos un segmento V α humano y al menos un segmento J α humano. En un ejemplo, el animal no humano comprende un locus TCR α humanizado que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 23, 25, 30, 35, 40, 45, 48, 50, o hasta 54 segmentos V α humanos. En algunos ejemplos, el locus TCR α humanizado comprende 2, 8, 23, 35, 48, o 54 segmentos V α humanos. Por tanto, en algunos ejemplos, el locus TCR α humanizado en el roedor puede comprender 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de V α humano; en algunos ejemplos, este puede comprender aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 90 %, o 100 % de V α humano.

En un ejemplo, el animal no humano comprende un locus TCR α que comprende un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de V α 40 a V α 41 humana (el segmento V α se denomina también "TRAV" o "TCRAV") y un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de 61 segmentos J α humanos (el segmento J α se denomina también "TRAJ" o "TCRAJ"). En un ejemplo, el animal no humano comprende un locus TCR α humanizado que comprende un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de TRAV35 a TRAV41 humanos y un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de 61 TRAJ humanos. En un ejemplo, el animal no humano comprende un locus TCR α humanizado que comprende un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de TRAV22 a TRAV41 humanos y un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de 61 TRAJ humanos. En un ejemplo, el animal no humano comprende un locus TCR α humanizado que comprende un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de TRAV13-2 a TRAV41 humanos y un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de 61 TRAJ humanos. En un ejemplo, el animal no humano comprende un locus TCR α humanizado que comprende un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de TRAV6 a TRAV41 humanos y 61 TRAJ humanos. En un ejemplo, el animal no humano comprende un locus TCR α humanizado que comprende un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de TRAV1-1 a TRAV 41 humanos y 61 TRAJ humanos. En diversos ejemplos, los fragmentos de ADN que comprenden secuencias humanas contiguas de segmentos de la región TCR α variable humana comprenden también sitios de enzimas de restricción, casetes de selección, sitios de endonucleasas, u otros sitios insertados para facilitar la clonación y la selección durante el proceso de humanización del locus. En diversos ejemplos, estos sitios adicionales no interfieren con el funcionamiento adecuado (por ejemplo, reordenamiento, el corte y empalme, etc.) de diversos genes en el locus TCR α .

En un ejemplo, el locus TCR α humanizado comprende 61 segmentos J α humanos o un 100 % de segmentos J α humanos. En un ejemplo particular, el locus TCR α humanizado comprende 8 segmentos V α humanos y 61 segmentos J α humanos; en otro ejemplo particular, el locus TCR α humanizado comprende 23 segmentos V α humanos y 61 segmentos J α humanos. En otro ejemplo particular, el locus TCR α humanizado comprende un repertorio completo de segmentos V α y J α humanos, es decir, todos los segmentos génicos de la región α variable humana codificados por el locus α , o 54 segmentos V α humanos y 61 segmentos J α humanos. En diversos ejemplos, el animal no humano no comprende ningún segmento V α o J α endógeno no humano en el locus TCR α .

El locus TCR β variable de ratón tiene aproximadamente 0,6 megabases y comprende un total de 33 segmentos V β , 2 segmentos D β , and 14 segmentos J β (Fig. 6). El locus TCR β variable humano tiene aproximadamente 0,6 megabases y comprende un total de 67 segmentos V β , 2 segmentos D β , y 14 segmentos J β . En un ejemplo, el animal no humano modificado genéticamente (por ejemplo, roedor, por ejemplo, ratón o rata) comprende al menos un segmento V β humano, al menos un segmento D β humano, al menos un segmento J β humano. En un ejemplo, el animal no humano comprende un locus TCR β humanizado que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 23, 25, 30, 35, 40, 45, 48, 50, 55, 60, o hasta 67 segmentos V β humanos. En algunos ejemplos, el locus TCR β humanizado comprende 8, 14, 40, 66, o 67 segmentos V β humanos. Por tanto, en algunos ejemplos, el locus TCR β humanizado en el animal no humano puede comprender 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de V β humano; en algunos ejemplos, este puede comprender aproximadamente 20 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 98 %, o 100 % de V β humano.

En un ejemplo, el animal no humano comprende un locus TCR β humanizado que comprende un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de segmentos V β 18 a V β 29-1 humanos (el segmento V β también se denomina como "TRBV" o "TCRBV"). En un ejemplo, el animal no humano comprende un locus TCR β humanizado que comprende un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de TRBV18 a TRBV29-1 humanos, un fragmento que comprende una secuencia humana contigua de D β 1-J β 1 humanos (es decir, segmentos D β 1-J β 1-1-J β 1-6 humanos), y un fragmento de ADN separado que comprende una secuencia humana contigua de D β 2-J β 2 humanos (es decir, segmentos D β 2-J β 2-1-J β 2-7 humanos). En un ejemplo, el animal no humano comprende un locus TCR β humanizado que comprende un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de TRBV6-5 a TRBV29-1 humanos, un fragmento que comprende una secuencia humana contigua de D β 1-J β 1 humanos (es decir, segmentos D β 1-J β 1-1-J β 1-6 humanos), y un fragmento de ADN separado que comprende una secuencia humana contigua de D β 2-J β 2 humanos (es decir, segmentos D β 2-J β 2-1-J β 2-7 humanos). En un ejemplo, el animal no humano comprende un locus TCR β humanizado que comprende un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de TRBV1 a TRBV29-1 humanos, un fragmento que comprende una secuencia

humana contigua de D β 1-J β 1 humanos, y un fragmento de ADN separado que comprende una secuencia humana contigua de D β 2-J β 2 humanos. En un ejemplo, el animal no humano comprende un locus TCR β humanizado que comprende un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de TRBV1 a TRBV29-1 humanos, un fragmento de ADN separado que comprende una secuencia humana contigua de D β 1-J β 1 humanos, un fragmento de ADN separado que comprende una secuencia humana contigua de D β 2-J β 2 humanos y un fragmento de ADN separado que comprende la secuencia de TRBV30 humano. En diversos ejemplos, los fragmentos de ADN que comprenden secuencias humanas contiguas de segmentos de la región TCR β variable humana comprenden también sitios de enzimas de restricción, casetes de selección, sitios de endonucleasas, u otros sitios insertados para facilitar la clonación y la selección durante el proceso de humanización del locus. En diversos ejemplos, estos sitios adicionales no interfieren con el funcionamiento adecuado (por ejemplo, reordenamiento, el corte y empalme, etc.) de diversos genes en el locus TCR β .

En un ejemplo, el locus TCR β humanizado comprende 14 segmentos J β humanos, o 100 % de segmentos J β humanos, y 2 segmentos D β humanos o 100 % de segmentos J β humanos. En otro ejemplo, el locus TCR β humanizado comprende al menos un segmento V β humano, por ejemplo, 14 segmentos V β humanos, y todos los segmentos D β y J β de ratón. En un ejemplo particular, el locus TCR β humanizado comprende 14 segmentos V β humanos, 2 segmentos D β humanos, y 14 segmentos J β humanos. En otro ejemplo particular, el locus TCR β humanizado comprende un repertorio completo de segmentos V β , D β , y J β humanos, es decir, todos los segmentos génicos de la región β variable humana codificados por el locus β o 67 segmentos V β humanos y 2 segmentos D β humanos, y 14 segmentos J β humanos. En un ejemplo, el animal no humano comprende un segmento V β no humano (por ejemplo, 5') en el locus TCR β humanizado. En diversos ejemplos, el animal no humano no comprende ningún segmento V β , D β , o J β endógeno no humano en el locus TCR β .

En diversos ejemplos, en el que el animal no humano (por ejemplo, roedor) comprende un repertorio de segmentos de la región TCR α y TCR β variable humana (y opcionalmente TCR δ y TCR γ humanos) (por ejemplo, un repertorio completo de segmentos de la región variable), el repertorio de diversos segmentos (por ejemplo, el repertorio completo de diversos segmentos) se utiliza por el animal para generar un repertorio diverso de moléculas TCR contra varios antígenos.

En diversos ejemplos, los animales no humanos comprenden partes contiguas de los loci variables TCR genómicos humanos que comprenden segmentos V, D, y J, o D y J, o V y J, o V organizados como en un locus variable genómico humano sin reorganizar, por ejemplo, que comprende secuencias promotoras, secuencias líderes, secuencias intergénicas, secuencias reguladoras, etc., organizadas en un locus variable TCR genómico humano. En otros ejemplos, los diversos segmentos se organizan como en un locus variable TCR genómico no humano si reorganizar. En diversos ejemplos del locus TCR α y/o β humanizado, el locus humanizado puede comprender dos o más segmentos genómicos humanos que no aparecen en un genoma humano yuxtapuesto, por ejemplo, un fragmento de segmentos V del locus V humano localizado en un genoma humano próximo a la región constante, yuxtapuesto con un fragmento de segmentos V del locus V humano localizado en un genoma humano en el extremo 5' del locus V humano.

Tanto en ratón como en ser humano, los segmentos génicos TCR δ se localizan con el locus TCR α (véanse las Figs. 2 y 5). Los segmentos TCR δ J y D se localizan entre los segmentos V α y J α , mientras que los segmentos TCR δ V se entremezclan a través del locus TCR α , con la mayoría localizada entre diversos segmentos V α . Se pueden determinar el número y las localizaciones de diversos segmentos TCR δ a partir de la base de datos IMGT. Debido a la reorganización genómica de los segmentos génicos TCR δ en el locus TCR α , la reorganización satisfactoria en el locus TCR α elimina generalmente los segmentos génicos TCR δ .

En algunos ejemplos, un animal no humano que comprende un locus de un gen TCR α variable humano comprende también al menos un segmento V δ humano, por ejemplo, hasta el repertorio completo de segmentos V δ humanos. Por tanto, en algunos ejemplos, la sustitución del locus endógeno del gen TCR α variable da como resultado una sustitución de al menos un segmento V δ no humano con un segmento V δ humano. En otros ejemplos, el animal no humano divulgado en el presente documento comprende un repertorio completo de segmentos V δ , D δ , y J δ humanos en el locus TCR α humanizado sin reorganizar; en otros ejemplos más, el animal no humano comprende un locus TCR δ humano sin reorganizar en el locus TCR α humanizado sin reorganizar (es decir, un locus TCR δ que incluye segmentos de la región variable humana, así como un potenciador y una región constante humanos). En la Fig.5 se representa un ejemplo para construir un locus TCR α humanizado sin reorganizar que comprende un locus TCR δ sin reorganizar completo.

En otro ejemplo más, el animal no humano divulgado en el presente documento comprende además un locus TCR γ humanizado sin reorganizar, por ejemplo, un locus TCR γ que comprende al menos unos segmentos V γ y al menos unos segmentos J γ humanos (por ejemplo, un repertorio completo de segmentos de la región variable V γ humana y J γ humana). El locus TCR γ humano está en el cromosoma 7 humano, mientras que el locus TCR γ de ratón está en el cromosoma 13 de ratón. Véase la base de datos IMGT para más detalle en el locus TCR γ .

En un ejemplo, el animal no humano (por ejemplo, roedor, por ejemplo, ratón o rata) que comprende los loci del gen TCR α y β variables humanizados (y, opcionalmente, los loci del gen TCR δ / γ variable opcionalmente humanizado)

descritos en el presente documento expresan un receptor de linfocitos T humanizado que comprende una región variable humana y una región constante no humana (por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratón o rata en la superficie de un linfocito T. En algunos ejemplos, el animal no humano es capaz de expresar un repertorio diverso de receptores de linfocitos T humanizados que reconocen varios antígenos presentados.

En diversos ejemplos, los polipéptidos del receptor de linfocitos T humanizados descritos en el presente documento comprenden secuencias líderes humanas. En ejemplos alternativos, las secuencias de ácido nucleico del receptor TCR humanizado se diseñan mediante ingeniería genética de tal manera que los polipéptidos TCR humanizados comprenden secuencias líderes no humanas.

Los polipéptidos TCR humanizados descritos en el presente documento pueden expresarse bajo el control de elementos reguladores no humanos endógenos (por ejemplo, elementos reguladores de roedores), por ejemplo, promotoras, silenciadores, potenciadoras, etc. Los polipéptidos TCR humanizados descritos en el presente documento pueden expresarse de forma alternativa bajo el control de elementos reguladores humanos. En diversos ejemplos, los animales no humanos descritos en el presente documento comprenden además todas las secuencias reguladoras y diferentes que se encuentran normalmente *in situ* en el genoma humano.

En diversos ejemplos, la región variable humana de la proteína TCR humanizada es capaz de interactuar con diversas proteínas sobre la superficie de la misma célula u otra célula. En un ejemplo, la región variable humana del TCR humanizado interactúa con los antígenos presentadores de proteínas MHC (proteínas MHC de clase I o II) sobre la superficie de la segunda célula, por ejemplo, una célula presentadora de antígeno (APC). En algunos ejemplos, la proteína MHC I o II es una proteína no humana (por ejemplo, roedores, por ejemplo, de ratón o rata). En otros ejemplos, la proteína MHC I o II es una proteína humana. En un ejemplo, la segunda célula, por ejemplo, la APC, es una célula no humana endógena que expresa una molécula MHC humana o humanizada. En un ejemplo diferente, la segunda célula es una célula humana que expresa una molécula MHC humana.

En un ejemplo, el animal no humano expresa un receptor de linfocitos T humanizados con una región constante no humana sobre la superficie de un linfocito T, en el que el receptor es capaz de interactuar con moléculas no humanas, por ejemplo, moléculas de anclaje o señalización expresadas en el linfocito T (por ejemplo, moléculas CD3, la cadena ζ , u otras proteínas ancladas al TCR a través de las moléculas CD3 o la cadena ζ).

Por tanto, en un ejemplo, se divulga un complejo celular, que comprende un linfocito T no humano que expresa un TCR que comprende una cadena TCR α humanizada como se describe en el presente documento y una cadena TCR β humanizada como se describe en el presente documento, y una célula presentadora de antígenos no humana que comprende un antígeno unido a un MHC I o MHC II. En un ejemplo, las cadenas TCR α y TCR β constantes no humanas se complejan con un homodímero de la cadena zeta (ζ) no humano y heterodímeros CD3. En un ejemplo, el complejo celular es un complejo celular *in vivo*. En una realización, el complejo celular es un complejo celular *in vitro*.

El animal no humano genéticamente modificado divulgado en el presente documento puede seleccionarse de un grupo que consiste en un ratón, rata, conejo, cerdo, bovino (por ejemplo, vaca, toro, búfalo), ciervo, oveja, cabra, gallina, gato, perro, hurón, primate (por ejemplo, tití, macaco de la India). Para los animales no humanos donde no están fácilmente disponibles las células ES genéticamente modificables adecuadas, se emplean otros métodos para producir un animal no humano que comprende la modificación genética. Tales métodos incluyen, por ejemplo, modificar un genoma de una célula distinta de ES (por ejemplo, un fibroblasto o una célula pluripotente inducida) y emplear transferencia nuclear para transferir el genoma modificado a una célula adecuada, por ejemplo, un oocito, y gestar la célula modificada (por ejemplo, el oocito modificado) en un animal no humano en condiciones adecuadas para formar un embrión.

En un ejemplo, el animal no humano es un mamífero. En un ejemplo, el animal no humano es un mamífero pequeño, por ejemplo, de la superfamilia Dipodoidea o Muroidea. En un ejemplo, el animal genéticamente modificado es un roedor. En un ejemplo, el roedor se selecciona de un ratón, una rata, y un hámster. En un ejemplo, el roedor se selecciona de la superfamilia Muroidea. En un ejemplo, el animal genéticamente modificado es de una familia seleccionada entre Calomyscidae (por ejemplo, hámsteres similares a ratones), Cricetidae (por ejemplo, hámster, ratas y ratones del nuevo mundo, campañoles), Muridae (ratones y ratas auténticos, jerbos, ratones espinosos, ratas con cresta), Nesomyidae (ratones trepadores, ratones de abazón de las rocas, ratas coliblanco, ratas y ratones de Madagascar), Platacanthomyidae (por ejemplo, lirón espinoso), y Spalacidae (por ejemplo, ratas topo, ratas del bambú, y zokores). En un ejemplo específico, el roedor genéticamente modificado se selecciona entre un ratón o rata auténtico (familia Muridae), un jerbo, un ratón espinoso, y una rata con cresta. En un ejemplo, el ratón genéticamente modificado es un miembro de la familia Muridae. En un ejemplo, el animal es un roedor. En un ejemplo específico, el roedor se selecciona entre un roedor y una rata. En un ejemplo, el animal no humano es un ratón.

En un ejemplo específico, el animal no humano es un roedor que es un ratón de una cepa C57BL seleccionada entre C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, y C57BL/Ola. En otro ejemplo, el ratón es una cepa 129 seleccionada entre el grupo que consiste en una cepa que es 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (por ejemplo, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (véase, *por.g.*, Festing *et al.*

(1999) Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome 10:836, *véase también*, Auerbach et al (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines). En un ejemplo específico, el ratón modificado genéticamente es una mezcla de una cepa 129 anteriormente mencionada y una cepa C57BL/6 anteriormente mencionada. En otro ejemplo específico, el ratón es una mezcla de las cepas 129 anteriormente mencionadas, o una mezcla de las cepas BL/6 anteriormente mencionadas. En un ejemplo específico, la cepa 129 de la mezcla es una cepa 129S6 (129/SvEvTac). En otro ejemplo, el ratón es una cepa BALB, por ejemplo, una cepa BALB/c. En otro ejemplo más, el ratón es una mezcla de una cepa BALB y otra cepa anteriormente mencionada.

10 En un ejemplo, el animal no humano es un rata. En un ejemplo, la rata se selecciona entre una rata Wistar, una cepa LEA, una cepa Sprague Dawley, una cepa Fischer, F344, F6, y Agouti oscuro. En un ejemplo, la cepa de la rata es una mezcla de dos o más cepas seleccionadas entre el grupo que consiste en Wistar, LEA, Sprague Dawley, Fischer, F344, F6, y Agouti oscuro.

15 Por tanto, en un ejemplo, se divulga en el presente documento un ratón genéticamente modificado que comprende en su genoma un locus de un gen TCR variable humano o humanizado sin reorganizar, por ejemplo, TCR α , TCR β , TCR δ , y/o el locus de un gen variable TCR γ . En algunos ejemplos, el locus del gen TCR variable humano o humanizado sin reorganizar sustituye el locus de gen TCR variable endógeno de ratón. En otros ejemplos, el locus del gen TCR variable humano o humanizado está en un sitio en el genoma diferente del locus TCR endógeno de ratón correspondiente. En algunos ejemplos, el locus del gen TCR variable humano o humanizado sin reorganizar está unido operativamente a la región TCR constante de ratón.

25 En un ejemplo, se divulga un ratón genéticamente modificado, en el que el ratón comprende en su genoma un locus de gen α variable de un receptor de linfocitos T sin reorganizar (TCR) que comprende al menos un segmento J α humano y al menos un segmento V α humano, unido operativamente a una secuencias génicas constantes de TCR α de ratón o rata, y un locus de un gen TCR β variable sin reorganizar que comprende al menos un segmento V β humano, al menos un segmento D β humano, y al menos un segmento J β humano, unido operativamente a una secuencia génica constante de TCR β . En un ejemplo específico, el ratón comprende en su genoma un locus de gen TCR α variable sin reorganizar que comprende un repertorio completo de segmentos J α humanos y un repertorio completo de segmentos V α humanos, unido operativamente a una secuencia génica constantes de TCR α de ratón, y un locus de un gen TCR β variable sin reorganizar que comprende un repertorio completo de segmentos J β humanos, un repertorio completo de segmentos D β humanos, y un repertorio completo de segmentos V β humanos, unido operativamente a una secuencia génica constante de TCR β .

35 En algunos ejemplos, el locus del gen TCR α variable sin reorganizar que comprende segmentos de la región TCR α variable humana sustituye el locus del gen TCR α variable endógeno de ratón y el locus del gen TCR β variable sin reorganizar que comprende segmentos de la región TCR β variable humana sustituye el locus del gen TCR β variable endógeno de ratón. En algunos ejemplos, los segmentos V α y J α endógenos de ratón son incapaces de reorganizarse para formar una secuencia V α /J α reorganizada, y los segmentos V β , D β , y J β endógenos de ratón son incapaces de reorganizarse para formar una secuencia V β /D β /J β reorganizada. En algunos ejemplos, los segmentos V α y J α humanos se reorganizan para formar una secuencia V α /J α humana reorganizada, y los segmentos V β , D β , y J β se reorganizan para formar una secuencia V β /D β /J β reorganizada.

45 En diversos ejemplos, los animales no humanos (por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratones o ratas descritos en el presente documento producen linfocitos T que son capaces de experimentar desarrollo tímico, progresando desde linfocitos T DN1 a DN2 a DN3 a DN4 a DP y a CD4 o CD8 SP. Dichos linfocitos T del animal no humano divulgado en el presente documento expresan moléculas superficiales celulares producidas normalmente por un linfocito T durante una etapa concreta del desarrollo tímico (por ejemplo, CD25, CD44, Kit, roedores CD3, pT α , etc.). Por tanto, los animales no humanos descritos en el presente documento expresan pT α complejo con TCR β en la etapa DN3 de desarrollo tímico. Los animales no humanos descritos en el presente documento expresan linfocitos T capaces de experimentar desarrollo tímico para producir linfocitos CD4+ y CD8+. Normalmente, el timo, la relación fisiológica de linfocitos T CD4+ a CD8+ está entre aproximadamente 2:1 y 3:1. Véase, por ejemplo, Ge y Stanley (2008) The O-fucose glycan in the ligand-binding domain of Notch 1 regulates embryogenesis and T cell development, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:1539-44. Por tanto, en un ejemplo, los animales no humanos descritos en el presente documento producen linfocitos T CD4+ y CD8+ T en el timo en una relación de entre aproximadamente 2:1 y 3:1 (CD4+:CD8+).

60 En diversos ejemplos, los animales no humanos descritos en el presente documento producen linfocitos T que son capaces de experimentar una diferenciación en linfocitos T normales en la periferia. En algunos ejemplos, los animales no humanos descritos en el presente documento son capaces de producir un repertorio normal de linfocitos T efectores, por ejemplo, LTC (linfocitos T citotóxicos), T_H1, T_H2, T_{REG}, T_H17, etc. Por tanto, en estos ejemplos, los animales no humanos descritos en el presente documento generan linfocitos T efectores que desempeñan diferentes funciones típicas del tipo de linfocito T concreto, por ejemplo, reconocen, se unen, y responden a antígenos extraños. En diversos ejemplos, los animales no humanos descritos en el presente documento producen linfocitos T efectores que destruyen células que expresan fragmentos peptídicos de patógenos citosólicos expresados en el contexto de moléculas MHC I; reconocen péptidos derivados de antígenos degradados en vesículas intracelulares y presentados mediante moléculas MHC II sobre la superficie de macrófagos e inducen macrófagos para destruir microorganismos;

producen citoquinas que impulsan la diferenciación de los linfocitos B; activan los linfocitos B para producir anticuerpos opsonizantes; inducen a las células epiteliales a producir quimioquinas que reclutan neutrófilos en los sitios de infección; etc.

- 5 En ejemplos adicionales, los animales no humanos descritos en el presente documento comprenden un número normal de linfocitos T CD3+ en la periferia, por ejemplo, en el bazo. En algunos ejemplos, el porcentaje de linfocitos T CD3+ periféricos en los animales no humanos descritos en el presente documento es el comparable al de los animales silvestres (es decir, animales que comprenden todos los segmentos de la región variable TCR endógena). En un ejemplo, los animales no humanos descritos en el presente documento comprenden una relación normal de linfocitos T CD3+ esplénicos a esplenocitos totales.

- 10 En otros ejemplos, los animales no humanos descritos en el presente documento son capaces de generar una población de linfocitos T con memoria en respuesta a un antígeno de interés. Por ejemplo, los animales no humanos divulgados en el presente documento generan linfocitos T con memoria central (Tcm) y linfocitos T con memoria efectora (Tem) contra un antígeno, por ejemplo, un antígeno de interés (por ejemplo, un antígeno que se ensaya para el desarrollo de vacunas, etc.).

- Los linfocitos DN1 y DN2 que no reciben suficientes señales (por ejemplo, señales Notch) pueden desarrollarse en linfocitos B, células mieloides (por ejemplo, células dendríticas), mastocitos y linfocitos NK. Véase, *por ejemplo*, Yashiro-Ohtani et al. (2010) Notch regulation of early thymocyte development, *Seminars in Immunology* 22:261-69. En algunos ejemplos, los animales no humanos descritos en el presente documento desarrollan cantidades normales de linfocitos B, células mieloides (por ejemplo, células dendríticas), mastocitos y linfocitos NK. En algunos ejemplos, los animales no humanos descritos en el presente documento desarrollan una población de células dendríticas normales en el timo.

- 25 El tipo predominante de receptores de linfocitos T expresados sobre la superficie de linfocitos T es TCR α/β , con la minoría de las células que expresan TCR δ/γ . En algunos ejemplos, los linfocitos T de los animales no humanos que comprenden loci TCR α y/o β humanizados presentan una utilización normal de los loci TCR α/β y TCR δ/γ , por ejemplo, una utilización de loci TCR α/β y TCR δ/γ que es similar al del animal silvestre (por ejemplo, los linfocitos T de los roedores descritos en el presente documento expresan las proteínas TCR α/β y TCR δ/γ en proporciones comparables a las expresadas por animales silvestres). Por tanto, en algunos ejemplos, los animales no humanos que comprenden TCR α/β humanizados y loci TCR δ/γ endógenos no humanos presentan una utilización normal de todos los loci.

- Además de los animales no humanos diseñados mediante ingeniería genética descritos en el presente documento, se divulga también un embrión no humano (por ejemplo, un embrión de roedor, por ejemplo, un embrión de ratón a un embrión de rata) en el que el embrión comprende una célula ES donante que se deriva de un animal no humano (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata) como se describe en el presente documento. En un ejemplo, el embrión comprende una célula ES donante que comprende un locus TCR humanizado sin reorganizar, y células de embriones hospedadores.

- 40 Se divulga también un tejido, en el que el tejido se deriva de un animal no humano (por ejemplo, un ratón o una rata) como se describe en el presente documento, y expresa un polipéptido TCR humanizado (por ejemplo, un polipéptido TCR α y/o TCR β , o TCR δ , y/o TCR γ).

- 45 Además, se proporciona una célula de roedor aislada de un roedor, como se describe en el presente documento. En una realización, la célula es una célula ES. En una realización, la célula es un linfocito T. En una realización, el linfocito T es un linfocito T CD4+. En otra realización, el linfocito T es un linfocito T CD8+.

- 50 Se divulga también una célula no humana que comprende un cromosoma o fragmento del mismo de un animal no humano como se describe en el presente documento. En un ejemplo, la célula no humana comprende un núcleo de un animal no humano como se describe en el presente documento. En un ejemplo, la célula no humana comprende el cromosoma o fragmento del mismo como el resultado de una transferencia nuclear.

- Se proporciona también una célula de roedor que expresa una proteína TCR que comprende una región variable humana y una región constante de roedor. La proteína TCR puede comprender TCR α , TCR β , o una combinación de los mismos. En una realización, la célula es un linfocito T, por ejemplo, un linfocito T CD4+ o una CD8+.

- 60 En un ejemplo, se divulga una célula pluripotente inducida no humana que comprende un locus TCR humanizado sin reorganizar que codifica un polipéptido TCR humanizado como se describe en el presente documento. En un ejemplo, la célula pluripotente inducida se deriva de un animal no humano, como se describe en el presente documento.

En un aspecto, se proporciona un hibridoma o cuadroma, derivado de una célula de roedor, como se describe en el presente documento. El roedor es, por ejemplo, un ratón o rata.

- 65 Se proporciona también un método para preparar un roedor genéticamente modificado (por ejemplo, un ratón o rata) descritos en el presente documento. El método para preparar un roedor genéticamente modificado da como resultado

el animal cuyo genoma comprende un locus TCR sin reorganizar humanizado (por ejemplo, un locus TCR α TCR β , TCR δ , y/o TCR γ humanizado sin reorganizar). Se divulga en el presente documento un método para preparar animales no humanos genéticamente modificados (por ejemplo, roedores, por ejemplo, un ratón o rata) que expresan un receptor de linfocitos T que comprende una región variable humana y una región constante no humana (por ejemplo, de roedor) sobre una superficie de un linfocito T, en el que el método comprende sustituir en un primer animal no humano un locus endógeno de un gen TCR α variable no humano con un locus de gen TCR α variable humanizado sin reorganizar que comprende al menos un segmento V α humano y al menos un segmento J α humano, en el que el locus del gen TCR β variable humanizado está unido operativamente a la región constante TCR α endógena; sustituyendo en un segundo animal no humano un locus del gen TCR β variable endógeno no humano con un locus del gen TCR β variable humanizado sin reorganizar que comprende al menos un segmento V β humano, un segmentos D β humano, y un segmento J β humano, en el que el locus del gen TCR β variable humanizado está unido operativamente a la región TCR β constante endógena; y cruzar el primer y el segundo animal no humanos para obtener un animal no humano que exprese un receptor de linfocitos T que comprende una región variable humana y una región constante no humana. En otros ejemplos, la invención divulga métodos para preparar un animal no humano genéticamente modificado cuyo genoma comprende un locus TCR α humanizado sin reorganizar, o un animal no humano cuyo genoma comprende un locus TCR β humanizado sin reorganizar, generado de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. En diversos ejemplos, las sustituciones se realizan en los loci endógenos. En algunos ejemplos, el método utiliza una o más construcciones de direccionamiento utilizando tecnología VELOCIGENE®, introduciendo la(s) construcción(ones) en células ES, e introduciendo los clones de células ES dirigidas en un embrión de ratón utilizando tecnología VELOCIMOUSE®, como se describe en los Ejemplos. En algunos ejemplos, las células ERS se derivan de un ratón que es una mezcla de cepas 129 y C57BL/6. En diversos ejemplos, el método comprende una estrategia de humanización progresiva, en el que una construcción que comprende segmentos adicionales de la región variable se introduce en células ES es cada etapa subsiguiente de humanización, dando como resultado en última instancia un ratón que comprende un repertorio completo de segmentos de la región variable humana (véase, por ejemplo, Las Figs. 3 y 7).

Por tanto, se divulgan también las construcciones de nucleótidos utilizadas para generar animales no humanos diseñados mediante ingeniería genética descritas en el presente documento. En un ejemplo, la construcción del nucleótido comprende: brazos de homología 5' y 3', un fragmento de ADN humano que comprende segmento(s) génicos(s) de la región TCR variable humana, y un casete de selección flanqueado por sitios recombinantes. En un ejemplo, el fragmento de ADN humano es un fragmento del gen TCR α y este comprende al menos un segmento de la región TCR α variable humana. En otro ejemplo, el fragmento de ADN humano es un fragmento del TCR β y este comprende al menos un segmento del gen de la región TCR β variable humana. En un ejemplo, al menos un brazo de homología es un brazo de homología no humano y este puede ser homólogo a un locus TCR no humano (por ejemplo, un locus TCR α o TCR β no humano).

Un casete de selección es una secuencia de nucleótidos insertada en una construcción de direccionamiento para facilitar la selección de células (por ejemplo, células ES) que tienen integrada la construcción de interés. Se conocen en la técnica numerosos casetes de selección adecuados. Habitualmente, un casete de selección permite la selección positiva en presencia de un antibiótico concreto (por ejemplo, Neo, Hyg, Pur, CM, Spec, etc.). Además, un casete de selección puede estar flanqueado por sitios de recombinación, que permiten la eliminación del casete de selección tras el tratamiento con enzimas recombinasas. Los sitios de recombinación comúnmente utilizados son *loxP* y *Frt*, reconocidos por las enzimas Cre y Flp, respectivamente, pero se conocen otros en la técnica.

El casete de selección puede estar localizado en el extremo 5' del fragmento de ADN humano. El casete de selección puede estar localizado en el extremo 3' del fragmento de ADN humano. El casete de selección puede estar localizado en el fragmento de ADN humano, por ejemplo, en el intrón humano. El casete de selección puede estar localizado en la unión del fragmento de ADN humano y de ratón.

Diversos ejemplos de la estrategia de direccionamiento para generar animales no humanos diseñados mediante ingeniería genética, las construcciones, y los vectores de direccionamiento utilizados para la misma se presentan en las Figs. 3, 4, 5, 7, y 8.

Tras la finalización del direccionamiento del gen, Se cribaron células ES o animales no humanos modificados genéticamente para confirmar la incorporación satisfactoria de la secuencia de nucleótidos exógena de interés o la expresión del polipéptido exógeno (por ejemplo, segmentos de la región TCR variable humana). Los expertos en la materia conocen numerosas técnicas, e incluyen (aunque no de forma limitativa) transferencia Southern, PCR larga, PCT cuantitativa (por ejemplo, PCR en tiempo real utilizando TAQMAN®), hibridación fluorescente *in situ*, transferencia Northern, citometría de flujo, análisis Western, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, etc. En un ejemplo, los animales no humanos (por ejemplo, ratones) que transportan la modificación genética de interés pueden identificarse mediante cribado para la pérdida del alelo de ratón y/o la ganancia del alelo humano utilizando una modificación del ensayo del alelo descrita en Valenzuela *et al.* (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659. Se conocen otros ensayos que identifican una secuencia de nucleótidos o aminoácidos específica en los animales modificados genéticamente por los expertos en la materia.

Se divulga en el presente documento un método para modificar un locus de gen TCR variable (por ejemplo, un locus del gen TCR α , TCR β , TCR δ , y/o TCR γ) de un animal no humano para expresar una proteína TCR humanizada descrita en el presente documento. En un ejemplo, se divulga en el presente documento un método para modificar un locus de un gen TCR variable que expresa una proteína TCR humanizada sobre una superficie de un linfocito T en el que el método comprende sustituir en un animal no humano un locus de un gen TCR variable endógeno no humano con un locus de un gen TCR variable humanizado sin reorganizar. En un ejemplo en el que el locus del gen TCR variable es un locus de gen TCR α variable, el locus del gen TCR variable humanizado sin reorganizar comprende al menos un segmento V α humano y al menos un segmento J α humano. En un ejemplo en el que el locus del gen TCR variable es un locus del gen TCR β variable, el locus del gen TCR variable humanizado sin reorganizar comprende al menos un segmento V β humano, al menos un segmento D β humano y al menos un segmento J β humano. En diversos ejemplos, el locus del gen TCR variable humanizado sin reorganizar está unido operativamente a una región TCR α constante endógena no humana correspondiente.

Se divulga también una proteína TCR humanizada fabricada por un animal no humano (por ejemplo, roedores, por ejemplo, un ratón o rata), como se describe en el presente documento, en la que la proteína TCR comprende una región variable humana y una región constante no humana. Por tanto, la proteína TCR humanizada comprende regiones determinantes de la complementariedad humanas (es decir, CDR 1, 2 y 3 humanas) en su dominio variable y una región constante no humana.

Aunque los Ejemplos siguientes describen un animal no humano diseñado mediante ingeniería genética cuyo genoma comprende un locus de un gen TCR α humanizado y un locus de un gen TCR β variable humanizado, un experto en la materia comprenderá que se puede usar una estrategia similar para producir animales diseñados mediante ingeniería genética cuyo genoma comprende un locus de un gen TCR δ y/o TCR γ variable humanizado. Se divulga también un animal no humano diseñado mediante ingeniería genética con humanización de todos los cuatro loci de genes TCR variables.

Uso de animales con TCR modificados genéticamente

En diversos ejemplos, los animales no humanos modificados genéticamente como se describen en el presente documento fabrican linfocitos T con moléculas TCR humanizadas en su superficie, y como resultado, reconocerían los péptidos que les presentan los complejos MHC de una manera similar a la humana. Los animales no humanos modificados genéticamente descritos en el presente documento se pueden usar para estudiar el desarrollo y la función de los linfocitos T humanos y los procesos de tolerancia inmunológica; para ensayar candidatos de vacunas humanas; para generar TCR con determinadas especificidades para el tratamiento génico de TCR; para generar bibliotecas de TCR contra antígenos asociados a enfermedades (por ejemplo, antígenos asociados a tumores (TAA); etc.

Existe un creciente interés en la técnica en el tratamiento con linfocitos T, ya que los linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos) pueden dirigirse para atacar y conducir a la destrucción del antígeno de interés, por ejemplo, un antígeno vírico, un antígeno bacteriano, un antígeno tumoral, etc., o las células que se le presentan. Los estudios iniciales en la terapia con linfocitos T tuvieron como objetivo el aislamiento de los linfocitos que se infiltraban en el tumor (TIL; las poblaciones de linfocitos en la masa tumoral que comprenden presumiblemente linfocitos T reactivos contra antígenos tumorales) de la masa de células tumorales, que se expandían *in vitro* utilizando factores de crecimiento de linfocitos T, y transfiriéndolos posteriormente al paciente en un proceso denominado transferencia de linfocitos T adoptivos. Véase, por ejemplo, Restifo et al. (2012) Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response, Nature Reviews 12:269-81; Linnemann et al. (2011) T-Cell Receptor Gene Therapy: Critical Parameters for Clinical Success, J. Invest. Dermatol. 131:1806-16. Sin embargo, el éxito de estas terapias ha estado hasta ahora limitado a melanoma y carcinoma de células renales; y la transferencia adoptiva de TIL no está dirigida específicamente a antígenos asociados a tumores definidos (TAA). Linnemann et al., anteriormente citado.

Se han hecho intentos de iniciar una terapia génica con TCR donde los linfocitos T bien se seleccionan o bien se programan para dirigirse a un antígeno de interés, por ejemplo, un TAA. La terapia génica con TCR actual se basa en la identificación de secuencias de varios TCR que se dirigen a antígenos específicos, por ejemplo, antígenos asociados a tumores. Por ejemplo, Rosenberg y colaboradores han publicado varios estudios en los que transdujeron linfocitos de sangre periférica derivados de un paciente de melanoma con genes que codifican cadenas TCR α y β específicas de los epítomos del antígeno MART-1 asociado con el melanoma, y utilizaron los linfocitos resultantes expandidos en una terapia de linfocitos T adoptivos. Johnson et al. (2009) Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen, Blood 114:535-46; Morgan et al. (2006) Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes, Science 314:126-29. Los TCR específicos de MART-1 se aislaron de pacientes que experimentaron regresión del tumor después de una terapia TIL. Sin embargo, la identificación de dichos TCR, especialmente de los TRC de alta avidéz (que tienen mayor probabilidad de ser terapéuticamente útiles), se complica por el hecho de que la mayoría de antígenos tumorales son autoantígenos, y los TCR que se dirigen a dichos antígenos frecuentemente bien están eliminados o tienen una afinidad por debajo de la óptima, debido principalmente a la tolerancia inmunitaria.

En diversos ejemplos, la presente divulgación resuelve este problema divulgando animales no humanos modificados genéticamente que comprenden en su genoma un locus de gen TCR variable humano. El animal no humano descrito

en el presente documento es capaz de generar linfocitos T con un repertorio diverso de receptor de linfocitos T humanizados. Por tanto, los animales no humanos descritos en el presente documento pueden ser una fuente de un repertorio diverso de receptores de linfocitos T humanizados, por ejemplo, receptores de linfocitos T humanizados de alta avidez para su uso en la transferencia adoptiva de linfocitos T.

Por tanto, se divulga en el presente documento un método para generar un receptor de linfocitos T contra un antígeno humano que comprende inmunizar un animal no humano (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o rata) descrito en el presente documento con un antígeno de interés, permitir al animal desencadenar una respuesta inmunitaria, aislar a partir del animal un linfocito T activado con especificidad por el antígeno de interés, y determinar la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T expresado por el linfocito T específico de antígeno.

Se divulga en el presente documento un método para producir un receptor de linfocitos T humano específico de un antígeno de interés (por ejemplo, un antígeno asociado con una enfermedad) que comprende inmunizar un animal no humano descrito en el presente documento con el antígeno de interés; permitir al animal desencadenar una respuesta inmunitaria; aislar del animal un linfocito T reactivo contra el antígeno de interés; determinar una secuencia de ácido nucleico de una región TCR variable humana expresada por el linfocito T; clonar la región TCR variable humana en una construcción de nucleótidos que comprende una secuencia de ácido nucleico de una región TCR constante humana de tal forma que la región TCR variable humana está operablemente unida a una región TCR constante humana; y expresar desde la construcción un receptor de linfocitos T humano específico del antígeno de interés. Las etapas de aislar un linfocito T, determinar una secuencia de ácido nucleico de una región TCR variable humana expresada por el linfocito T, clonar la región TCR variable humana en una construcción de nucleótidos que comprende una secuencia de ácido nucleico de una región TCR constante humana, y expresar un receptor de linfocitos T humano pueden realizarse usando técnicas convencionales conocidas del experto en la materia.

En un ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica un receptor de linfocitos T específico de un antígeno de interés se expresa en una célula. En un ejemplo, la célula que expresa el TCR se selecciona entre células CHO, COS, 293, HeLa, PERC.6™, etc.

El antígeno de interés puede ser cualquier antígeno conocido por producir o estar asociado con una enfermedad o dolencia, por ejemplo, un antígeno asociado a un tumor; un antígeno de origen vírico, bacteriano, u otro origen patógeno; etc. Se conocen en la técnica muchos antígenos asociados a tumores. Una selección de antígenos asociados a tumores se presenta en la Cancer Immunity (A Journal of the Cancer Research Institute) Peptide Database (archive.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcallepitopes.htm). En algunos ejemplos, el antígeno de interés es un antígeno humano, por ejemplo, un antígeno asociado a un tumor humano. En algunos ejemplos, el antígeno es un antígeno intracelular específico del tipo de célula, y se utiliza un receptor de linfocitos T para destruir una célula que expresa el antígeno.

Se divulga en el presente documento un método para identificar un linfocito T con especificidad contra un antígeno de interés, por ejemplo, un antígeno asociado a un tumor, que comprende inmunizar un animal no humano descrito en el presente documento con el antígeno de interés, permitir al animal desencadenar una respuesta inmunitaria, y aislar del animal no humano un linfocito T con especificidad por el antígeno.

Se divulgan en el presente documento nuevos métodos para una terapia de linfocitos T adoptivos. Por tanto, se divulga en el presente documento un método para tratar o mejorar una enfermedad o dolencia (por ejemplo, un cáncer) en un sujeto (por ejemplo, un sujeto mamífero, por ejemplo, un sujeto humano) que comprende inmunizar un animal no humano descrito en el presente documento con un antígeno asociado con la enfermedad o dolencia, permitir al animal desencadenar una respuesta inmunitaria, aislar del animal una población de linfocitos T específicos de antígeno, e infundir los linfocitos T específicos de antígeno al sujeto. Se divulga en el presente documento un método para tratar o mejorar una enfermedad o dolencia en un sujeto humano, que comprende inmunizar el animal no humano descrito en el presente documento con un antígeno de interés (por ejemplo, un antígeno asociado a una enfermedad o dolencia, por ejemplo, un antígeno asociado a un tumor), permitir al animal desencadenar una respuesta inmunitaria, aislar del animal una población de linfocitos T específicos de antígeno, determinar la secuencia de ácido nucleico de un receptor de linfocitos T expresado por linfocitos T específicos de antígeno, clonar la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T en un vector de expresión (por ejemplo, un vector retroviral), introducir el vector en linfocitos T derivados del sujeto de tal forma que linfocitos T expresan el receptor de linfocitos T específico de antígeno, e infundir los linfocitos T en el sujeto. La secuencia del ácido nucleico del receptor de linfocitos T puede humanizarse además previamente antes de su introducción de los linfocitos T derivados del sujeto, por ejemplo, la secuencia que codifica la región constante no humana puede modificarse para parecerse adicionalmente a una región constante TCR humana (por ejemplo, la región constante no humana puede sustituirse por una región constante humana). En algunos ejemplos, la enfermedad o dolencia es cáncer. En algunos ejemplos, una población de linfocitos T específicos de antígeno se expande previamente antes de infundirlos al sujeto. En algunos ejemplos, la población de células inmunitarias del sujeto está inmunoagotada antes de la infusión de los linfocitos T específicos de antígeno. En algunos ejemplos, el TCR específico de antígeno es un TCR de avidez elevada, por ejemplo, un TCR de avidez elevada por un antígeno asociado a un tumor. En algunos ejemplos, el linfocito T es un linfocito T citotóxico. En otros ejemplos, la enfermedad o dolencia está causada por un virus o una bacteria.

En otro ejemplo, una enfermedad o dolencia puede ser una enfermedad autoinmunitaria. Los linfocitos $_{REG}$ son una subpoblación especializada de linfocitos T que mantienen la tolerancia a los autoantígenos y evitan la autorreactividad patológica. Por tanto, también se divulgan en el presente documento métodos para tratar una enfermedad autoinmunitaria que se basan en la generación de linfocitos T_{REG} específicos de antígeno en el animal no humano de la invención descrita en el presente documento.

También se divulga en el presente documento un método para tratar o mejorar una enfermedad o dolencia (por ejemplo, un cáncer) en un sujeto que comprende introducir las células afectadas por la enfermedad o dolencia (por ejemplo, células cancerosas) del sujeto en un animal no humano, permitir al animal desencadenar una respuesta inmunitaria contra las células, aislar del animal una población de linfocitos T reactivos contra las células, determinar la secuencia de ácido nucleico de un receptor de linfocitos T expresado por los linfocitos T, clonar la secuencia del receptor de linfocitos T en un vector, introducir el vector en linfocitos T derivados del sujeto, e infundir los linfocitos T del sujeto que tienen el receptor de linfocitos T en el sujeto.

También se divulga en el presente documento el uso de un animal no humano como se describe en el presente documento para preparar secuencias de ácido nucleico que codifican dominios de TCR variable humanos (por ejemplo, dominios de TCR α y/o β variables). Se divulga un método para preparar una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de TCR variable humano, que comprende inmunizar un animal no humano como se describe en el presente documento con un antígeno de interés, permitir que el animal no humano presente una respuesta inmunitaria al antígeno de interés, y obtener a partir del mismo una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio TCR variable humano que se une al antígeno de interés. En un ejemplo, el método comprende adicionalmente preparar una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio de TCR variable humano que está operablemente unido a una región TCR constante humana, que comprende aislar un linfocito T de un animal no humano descrito en el presente documento y obtener a partir del mismo la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio TCR variable unido a la región TCR constante.

También se divulga en el presente documento el uso de un animal no humano como se describe en el presente documento para preparar una sustancia terapéutica para seres humanos, que comprende inmunizar el animal no humano con un antígeno de interés (por ejemplo, un antígeno asociado a un tumor), permitir al animal no humano desencadenar una respuesta inmunitaria, obtener del animal linfocitos T reactivos contra el antígeno de interés, obtener a partir de los linfocitos T una o varias secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína TCR humanizada que se une al antígeno de interés, y utilizar la una o varias secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína TCR humanizada en una sustancia terapéutica para seres humanos.

Por tanto, también se divulga un método para preparar una sustancia terapéutica para seres humanos, que comprende inmunizar un animal no humano como se describe en el presente documento con un antígeno de interés, permitir al animal no humano desencadenar una respuesta inmunitaria, obtener del animal linfocitos T reactivos contra el antígeno de interés, obtener a partir de los linfocitos T una o varias secuencias de ácidos nucleicos que codifican un receptor de células T humanizado que se une al antígeno de interés, y utilizar el receptor de linfocitos T humanizado en una sustancia terapéutica para seres humanos.

La sustancia terapéutica para seres humanos puede ser un linfocito T (por ejemplo, un linfocito T humano, por ejemplo, un linfocito T derivado de un sujeto humano) que contiene una secuencia de ácido nucleico de interés (por ejemplo, transfectada o transducida o introducida de otra forma con el ácido nucleico de interés) de tal forma que el linfocito T expresa la proteína TCR humanizada con afinidad por un antígeno de interés. Un sujeto en el que se emplea la sustancia terapéutica puede necesitar una terapia para una enfermedad o dolencia concreta, y el antígeno puede estar asociado con la enfermedad o dolencia. El linfocito T puede ser un linfocito T citotóxico, el antígeno puede ser un antígeno asociado a un tumor, y la enfermedad o dolencia puede ser un cáncer. El linfocito T puede derivar del sujeto.

La sustancia terapéutica para seres humanos puede ser un receptor de linfocitos T. El receptor terapéutico puede ser un receptor de linfocitos T soluble. Se ha realizado un importante esfuerzo para generar receptores de linfocitos T solubles o regiones TCR variables para su uso en agentes terapéuticos. La generación de receptores de linfocitos T solubles depende de la obtención de regiones TCR variables reorganizadas. Un enfoque para esto es diseñar TCR monocatenarios que comprenden TCR α y TCR β , y, análogamente al formato de scFv de inmunoglobulinas, fusionarlas entre sí con un enlazador (véase, *por ejemplo*, la solicitud Internacional n.º WO 2011/044186). El scTv resultante, si es análogo al scFv, proporcionaría una forma térmicamente estable y soluble de la proteína de unión a TCR α/β . Enfoques alternativos incluyen diseñar un TCR soluble que tiene dominios TCR β constantes (véase, *por ejemplo*, Chung et al., (1994) Functional three-domain single-chain T-cell receptors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:12654-58); y también genomanipularse un enlace disulfuro no natural en la interfase entre dominios TCR constantes (*revisado en* Boulter y Jakobsen (2005) Stable, soluble, high-affinity, engineered T cell receptors: novel antibody-like proteins for specific targeting of peptide antigens, Clinical and Experimental Immunology 142:454-60; véase *también*, la patente de Estados Unidos n.º 7,569,664). Se han descrito otros formatos de receptores de linfocitos T solubles. Los animales no humanos descritos en el presente documento se pueden usar para determinar una secuencia de un receptor de linfocitos T que se une con alta afinidad a un antígeno de interés, y diseñar posteriormente un receptor de linfocitos T soluble basándose en la secuencia.

Un receptor de linfocitos T soluble derivado de la secuencia del receptor de TCR expresado mediante el animal no humano se puede utilizar para bloquear la función de una proteína de interés, por ejemplo, una proteína vírica, bacteriana o asociada a un tumor. Como alternativa, un receptor de linfocitos T soluble se puede fusionar a un resto que puede destruir una célula infectada o una célula cancerosa, por ejemplo, moléculas citotóxicas (por ejemplo, una sustancia quimioterapéutica), toxina, radionucleido, profármaco, anticuerpo, etc. Un receptor de linfocitos T soluble también se puede fusionar con una molécula inmunomoduladora, por ejemplo, una citoquina, quimioquina, etc. Un receptor de linfocitos T soluble también se puede fusionar con una molécula inmunoinhibidora, por ejemplo, una molécula que impide que un linfocito T destruya otras células que tienen un antígeno que puede reconocer el linfocito T. Dichos receptores de linfocitos T solubles fusionados con moléculas inmunoinhibidoras se pueden usar, por ejemplo, para bloquear la autoinmunidad. Varias moléculas inmunoinhibidoras ilustrativas que se pueden fusionar con un receptor de linfocitos T soluble se han revisado en Ravetch y Lanier (2000) Immune Inhibitory Receptors, Science 290:84-89.

La presente invención también divulga métodos para estudiar la respuesta inmunitaria en el contexto de TCR humano, que incluyen reorganización de TCR humano, desarrollo de linfocitos T, activación de linfocitos T, tolerancia inmunitaria, etc.

También se divulgan métodos para someter a ensayo vacunas candidatas. Se divulga en el presente documento un método para determinar si una vacuna activará una respuesta inmunitaria (por ejemplo, proliferación de linfocitos T, liberación de citoquinas, etc.), y conduzcan a la generación de linfocitos T efectoras, así como linfocitos T de memoria (por ejemplo, linfocitos T centrales y efectoras con función de memoria).

Ejemplos

La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos. Se muestran estos ejemplos para ayudar en la comprensión de la invención aunque no se pretende, y no debería considerarse que, limitan su alcance en ningún modo. Los Ejemplos no incluyen descripciones detalladas de los métodos convencionales que conocerán bien las personas normalmente expertas en la materia (técnicas de clonación molecular, etc.). Salvo que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es un peso molecular promedio, la temperatura se indica en grados Celsius y la presión es la atmosférica o próxima a esta.

Ejemplo 1. Generación de ratones con loci de genes variables TCR humanizados

Los ratones que comprenden una delección de los loci endógenos variables TCR (α o β) y la sustitución por los segmentos endógenos V y J o V, D, y J se prepararon utilizando la tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.586.251 y Valenzuela, D.M., et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. Nat. Biotech. 21(6): 652-659), en la que las secuencias humanas derivadas de bibliotecas BAC que utilizan recombinación homóloga bacteriana se utilizan para preparar vectores de direccionamiento grandes (LTVEC) que comprenden fragmentos genómicos de los loci TCR variables humanos flanqueados por brazos de direccionamiento para dirigir los LTVEC a los loci TCR variables endógenos de ratón en células ES de ratón. Los LTVEC se linealizaron y electroporaron en una línea de células ES de ratón de acuerdo con Valenzuela et al. Las células ES se seleccionaron según la resistencia a la higromicina o la neomicina, y se cribaron según la pérdida del alelo de ratón o la obtención del alelo humano.

Los clones de células ES dirigidos se introducen en embriones de ratón en el estado de 8 células (o anteriores) por el método VELOCIMOUSE® (Poueymirou, W.T. et al. (2007). F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses. Nat. Biotech. 25: 91-99.). Se identificaron VELOCIMICE® (ratones F0 completamente derivados de la célula ES donante) que loci TCR portaban humanizados mediante cribado por pérdida del alelo TCR variable endógeno y la obtención del alelo humano usando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela et al.). Las crías F0 se genotiparon y se reprodujeron para producir homocigosidad. Los ratones homocigóticos para los loci TCR α y/o TCR β variables humanos (por ejemplo, que comprenden un subconjunto de segmentos TCR α y/o TCR β variables humanos) se prepararon y se fenotiparon como se describe en el presente documento.

Todos los ratones se alojaron y se reprodujeron en la instalación específica exenta de patógenos de Regeneron Pharmaceuticals. Todos los experimentos con animales fueron autorizados por el IACUC y Regeneron Pharmaceuticals.

Ejemplo 2: Humanización progresiva del locus TCR α variable

1,5 megabases de ADN del locus TCR α correspondientes a los segmentos 110 V y 60 J de ratón se sustituyeron por 1 megabase de ADN correspondiente a los segmentos 54V y 61J de TCR α humano usando una estrategia de humanización progresiva resumida en las Figs. 2 y 3. Las secuencias de ácidos nucleicos de unión de diferentes vectores de direccionamiento utilizados en la estrategia de humanización progresiva del locus TCR α se resumen en la Tabla 2, y se incluyen en el Listado de secuencias.

Tabla 2: Secuencias de ácidos nucleicos de unión de diferentes vectores de direccionamiento del locus TCR α

MAID NO.	SEQ ID NO	Descripción
1626	1	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la secuencia de ratón antes del locus TCR α variable y el extremo 5' del casete <i>loxP</i> -Ub-Hyg- <i>loxP</i> .
	2	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' del casete <i>loxP</i> -Ub-Hyg- <i>loxP</i> y el extremo 5' de la inserción TCRV α 40-TCRV α 41-TCRJ α 1 humana, incluido el sitio AsiSI.
	3	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la inserción TCRV α 40-TCRV α 41-TCRJ α 1 humana y el extremo 5' de la secuencia de ratón posterior al locus TCR α variable humano, incluido el sitio NotI.
1767	4	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la secuencia de ratón antes del locus TCR α variable y el extremo 5' del casete <i>loxP</i> -Ub-Neo- <i>loxP</i> .
	5	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' del casete <i>loxP</i> -Ub-Neo- <i>loxP</i> y el extremo 5' de la inserción TCRV α 35-TCRV α 39 humana, incluido el sitio AsiSI.
1979	6	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la secuencia de ratón antes del locus TCR α variable y el extremo 5' del casete <i>frt</i> -Pgk-Hyg- <i>frt</i> .
	7	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' del casete <i>frt</i> -Pgk-Hyg- <i>frt</i> y el extremo 5' de la inserción TCRV α 22-TCRV α 34 humana, incluido el sitio AsiSI.
1769	8	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la secuencia de ratón antes del locus TCR α variable y el extremo 5' del casete <i>loxP</i> -Ub-Neo- <i>loxP</i> .
	9	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' del casete <i>loxP</i> -Ub-Neo- <i>loxP</i> y el extremo 5' de la inserción TCRV α 13-2-TCRV α 21 humana, incluido el sitio AsiSI.
1770	10	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la secuencia de ratón antes del locus TCR α variable y el extremo 5' del casete <i>loxP</i> -Ub-Hyg- <i>loxP</i> .
	11	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' del casete <i>loxP</i> -Ub-Hyg- <i>loxP</i> y el extremo 5' de la inserción TCRV α 6-TCRV α 8-5 humana, incluido el sitio AsiSI.
1771	12	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la secuencia de ratón anterior y el locus TCR α variable y el extremo 5' del casete <i>loxP</i> -Ub-Neo- <i>loxP</i> .
	13	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' del casete <i>loxP</i> -Ub-Neo- <i>loxP</i> y el extremo 5' de la inserción TCRV α 1-1-TCRV α 5 humana, incluido el sitio AsiSI.
Los segmentos de la región TCR α variable humana están numerados en según la base de datos IMGT. Se han incluido al menos 100 pb en cada unión (al menos 50 pb desde cada extremo) en el Listado de secuencias.		

- 5 Específicamente, como se demuestra en la Fig. 4A, el ADN del clon BAC RP23-6A14 (Invitrogen) se modificó mediante recombinación homóloga y se usó como vector de direccionamiento (MAID 1539) para sustituir la región TCRAJ1-TCRAJ28 del locus TCR α endógeno de ratón por un casete de Ub-higromicina seguido por un sitio *loxP*. El ADN del clon BAC RP23-117i19 (Invitrogen) se modificó mediante recombinación homóloga y se usó como vector de direccionamiento (MAID 1535) para sustituir una región de ~15 kb que rodea (e incluye) TCRAV1 de los locus TCR α y δ endógenos de ratón por un casete de PGK-neomicina seguido por un sitio *loxP*. Las células ES que tienen un cromosoma con doble direccionamiento (es decir, un locus TCR α endógeno de ratón individual que es diana específica de ambos vectores de direccionamiento) se confirmaron por métodos de cariotipado y cribado (por ejemplo, TAQMANTM) conocidos en la materia. Las células ES modificadas se trataron con CRE recombinasa, mediando de esta forma la delección de las regiones comprendidas entre los dos sitios *loxP* (es decir, la región que consiste en el locus TCR α endógeno de ratón de TCRAV1 a TCRAJ1) y dejando detrás solamente el sitio *loxP*, el casete de neomicina, y las regiones constante y potenciadora de ratón. Esta estrategia dio como resultado la generación de un locus TCR α/δ eliminado de ratón (MAID 1540).

El primer vector de direccionamiento humano de TCR α tenía 191.660 pb de ADN humano entre los clones BAC CTD2216p1 y CTD2285m07 (Invitrogen) que contenían los dos primeros segmentos génicos TCR α V humanos consecutivos (TRAV40 & 41) y los 61 segmentos génicos TCR α J (50 funcionales). Este BAC se modificó mediante recombinación homóloga para contener un sitio Not1 situado 403 pb después (en dirección 3') del segmento génico TCR α J para la unión de un brazo de homología de ratón en la dirección 3' y un sitio AsiSI en 5' para la unión de un brazo de homología de ratón en la dirección 5'. Se usaron dos brazos de homología diferentes para la unión de este fragmento humano: el brazo de homología en la dirección 3' contenía las secuencias TCR α endógenas de ratón derivadas del clon BAC RP23-6A14 y el brazo de homología en la dirección 5' contenía la secuencia TCR α endógena en la dirección 5' de TCR α V de ratón derivada del clon BAC RP23-117i19. Este BAC ratón-ser humano quimérico se usó como vector de direccionamiento (MAID 1626) para fabricar una inserción inicial de los segmentos génicos de TCR α humano junto con un casete anterior *loxP*-ub-higromicina-*loxP* en los loci TCR α de ratón (Fig. 4B). Las secuencias de los ácidos nucleicos de unión (SEQ ID NOs: 1-3) del vector de direccionamiento MAID 1626 se describen en la Tabla 2.

Posteriormente, se prepararon una serie de vectores de direccionamiento que utilizaron el mismo brazo en la dirección 5' que contenía la secuencia de TCR α endógena en la dirección 5' de TCR α V de ratón derivada del clon BAC RP23-117i19 con casetes de selección alternantes de *loxP*-neomicina-*loxP* y *loxP*-higromicina-*loxP* (o *frt*-higromicina-*frt* para MAID 1979).

Para generar un mini-locus TCR α humano que contiene un total de 8 segmentos génicos TCR α V humanos (7 funcionales) y 61 TCR α J humanos (50 funcionales), el ADN derivado del clon BAC RP11-349p11 humano (Invitrogen) se modificó mediante recombinación homóloga y se usó como vector de direccionamiento (MAID 1767) (Fig. 4C). Esto añadió 104.846 pb de ADN humano que contenía los siguientes 6 segmentos génicos (5 funcionales) consecutivos de TCR α V humano (TRAV35 a TRAV39) y un casete de *loxP*-ub-neomicina-*loxP* en la dirección 5'. El locus TCR α resultante contenía un casete *loxP*-ub-neomicina-*loxP* en la dirección 5' junto con un total de 8 segmentos génicos TCR α V (7 funcionales) humanos y 61 TCR α J humanos unidos operativamente a genes y potenciadores de TCR α de ratón. Las secuencias de los ácidos nucleicos de unión (SEQ ID NOs: 4 y 5) del vector de direccionamiento MAID 1767 se describen en la Tabla 2.

Para generar un mini-locus TCR α humano que contiene un total de 23 segmentos génicos TCR α V humanos (17 funcionales) y 61 TCR α J humanos, ADN procedente de un clon BAC que contiene, en dirección de 5' a 3': un sitio I-Ceul único, un brazo de 20 kb de TCRA de ratón en dirección 5' del locus TCRA de ratón a utilizar para la recombinación homóloga en células ES, y un casete *loxP*-Ub-Hyg-*loxP* en orientación invertida, se modificó mediante recombinación homóloga bacteriana para contener en dirección 5' a 3': un sitio I-Ceul único, un brazo de 20 kb de TCRA de ratón en dirección 5' del locus TCRA de ratón, un casete *frt*-pgk-Hyg-*frt*, y un sitio AsiSI único. ADN procedente de un clon BAC RP11-622o20 humano (Invitrogen), que contiene el TCR α V22-V34 humano se modificó mediante recombinación homóloga para contener un casete Spec flanqueado por sitios I-Ceul y AsiSI únicos. Posteriormente, el casete Spec del clon BAC humano modificado se sustituyó por la secuencia comprendida entre los sitios I-Ceul y AsiSI del clon BAC de ratón modificado mediante técnicas convencionales de digestión con restricción/ligadura. El vector de direccionamiento resultante (MAID 1979; Fig. 4D) añadió 136.557 pb de ADN humano que contenía los siguientes 15 segmentos génicos (10 funcionales) consecutivos del TCR α J humano (TRAV22 a TRAV34) y un casete *frt*-pgk-Hyg-*frt* en dirección 5'. El locus TCR α resultante contenía un casete *frt*-pgk-Hyg-*frt* en dirección 5' junto con un total de 23 segmentos génicos de TCR α V (17 funcionales) humanos y 61 de TCR α V humanos unidos operativamente a genes y potenciadores de TCR α de ratón. Las secuencias de los ácidos nucleicos de unión (SEQ ID NOs: 6 y 7) del vector de direccionamiento MAID 1979 se describen en la Tabla 2.

Para generar un mini-locus TCR α humano que contiene un total de 35 segmentos génicos TCR α V humanos (28 funcionales) y 61 TCR α J humanos, el ADN derivado del clon BAC CTD2501-k5 humano (Invitrogen) se modificó mediante recombinación homóloga y se usó como vector de direccionamiento (MAID 1769) (Fig. 4E). Esto añadió 124.118 pb de ADN humano que contenían los siguientes 12 segmentos génicos (11 funcionales) consecutivos de TCR α V humano (TRAV13-2 a TRAV21) y un casete de *loxP*-ub-neomicina-*loxP* en la dirección 5'. El locus TCR α resultante contenía un casete *loxP*-ub-neomicina-*loxP* en la dirección 5' junto con un total de 35 segmentos génicos TCR α V (28 funcionales) humanos y 61 TCR α J humanos unidos operativamente a genes y potenciadores de TCR α de ratón. Las secuencias de los ácidos nucleicos de unión (SEQ ID NOs: 8 y 9) del vector de direccionamiento MAID 1769 se describen en la Tabla 2.

Para generar un mini-locus TCR α humano que contiene un total de 48 segmentos génicos TCR α V humanos (39 funcionales) y 61 TCR α J humanos, el ADN derivado del clon BAC RP11-92F11 humano (Invitrogen) se modificó mediante recombinación homóloga y se usó como vector de direccionamiento (MAID 1770) (Fig. 4F). Esto añadió 145.505 pb de ADN humano que contenía los siguientes 13 segmentos génicos (11 funcionales) consecutivos de TCR α J humano (TRAV6 a TRAV8.5) y un casete de *loxP*-ub-neomicina-*loxP* en la dirección 5'. El locus TCR α resultante contenía un casete *loxP*-ub-higromicina-*loxP* en la dirección 5' junto con un total de 48 segmentos génicos TCR α V (39 funcionales) humanos y 61 TCR α J humanos unidos operativamente a genes y potenciadores de TCR α de ratón. Las secuencias de los ácidos nucleicos de unión (SEQ ID NOs: 10 y 11) del vector de direccionamiento MAID 1770 se describen en la Tabla 2.

Para generar un mini-locus TCR α humano que contiene un total de 54 segmentos génicos TCR α V humanos (45 funcionales) y 61 TCR α J humanos, el ADN derivado del clon BAC RP11-780M2 humano (Invitrogen) se modificó mediante recombinación homóloga y se usó como vector de direccionamiento (MAID 1771) (Fig. 4G). Esto añadió 148.496 pb de ADN humano que contenían los siguientes 6 segmentos génicos (6 funcionales) consecutivos de TCR α V humano (TRAV1-1 a TRAV5) y un casete de *loxP*-ub-neomicina-*loxP* en la dirección 5'. El locus TCR α resultante contenía un casete *loxP*-ub-neomicina-*loxP* en la dirección 5' junto con un total de 54 segmentos génicos TCR α V (45 funcionales) humanos y 61 TCR α J humanos unidos operativamente a genes y potenciadores de TCR α de ratón. Las secuencias de los ácidos nucleicos de unión (SEQ ID NOS: 12 y 13) del vector de direccionamiento MAID 1771 se describen en la Tabla 2.

En cualquiera de las etapas anteriores, los casetes de selección se eliminaron por deleción con Cre o Flp recombinasa. Además, el locus TCR δ humano se puede introducir como se representa gráficamente en la Fig. 5.

Ejemplo 3: Humanización progresiva del locus TCR β variable

0,6 megabases de ADN del locus TCR β de ratón correspondientes a los segmentos 33 V, 2 D, y 14 J de ratón se sustituyeron con 0,6 megabases de ADN correspondiente a los segmentos 67 V, 2D, y 14 J de TCR β humano usando una estrategia de humanización progresiva resumida en las Figs. 6 y 7. Las secuencias de ácidos nucleicos de unión de diferentes vectores de direccionamiento utilizados en la estrategia de humanización progresiva del locus TCR β se resumen en la Tabla 3, y se incluyen en el Listado de secuencias.

Tabla 3: Secuencias de ácidos nucleicos de unión de diferentes vectores de direccionamiento del locus TCR β

MAID NO.	SEQ ID NO	Descripción
1625	14	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la secuencia de ratón anterior del locus TCR β variable (cerca de los genes del tripsinógeno de ratón anteriores) y el extremo 5' del casete <i>frt</i> -Ub-Neo- <i>frt</i> .
	15	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' del casete <i>frt</i> -Ub-Neo- <i>frt</i> y el extremo 5' de la inserción TCRV β 18-TCRV β 29-1 humana.
	16	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la inserción TCRV β 18-TCRV β 29-1 humana y el extremo 5' de la secuencia de ratón posterior de los segmentos TCRV β de ratón (cerca de los genes del tripsinógeno de ratón posteriores).
	17	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de los genes del tripsinógeno de ratón posteriores y el extremo 5' de la inserción TCRD β 1-TCRJ β 1-1-TCRJ β 1-6 humana, incluido el sitio Icel.
1715	18	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la inserción TCRD β 1-TCRJ β 1-1-TCRJ β 1-6 humana y el extremo 5' del casete <i>loxP</i> -Ub-Hyg- <i>loxP</i> .
	19	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' del casete <i>loxP</i> -Ub-Hyg- <i>loxP</i> y el extremo 5' de la secuencia de ratón cercana al gen C β 1 de ratón.
	20	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la secuencia de ratón cercana al gen C β 1 de ratón y el extremo 5' de la inserción TCRD β 2-TCRJ β 2-1-TCRJ β 2-7 humana, incluido el sitio NotI.
	21	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la inserción TCRD β 2-TCRJ β 2-1-TCRJ β 2-7 humana y el extremo 5' de la secuencia de ratón posterior del locus TCR β variable (cercana a la secuencia C β 2 de ratón).
1791	22	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la secuencia de ratón anterior del locus TCR β variable (cerca de los genes del tripsinógeno de ratón anteriores) y el extremo 5' del casete <i>frt</i> -Ub-Hyg- <i>frt</i> .
	23	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' del casete <i>frt</i> -Ub-Hyg- <i>frt</i> y el extremo 5' de la inserción TCRV β 6-5-TCRV β 17 humana.
1792	24	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la secuencia de ratón anterior del locus TCR β variable (cerca de los genes del tripsinógeno de ratón anteriores) y el extremo 5' del casete <i>frt</i> -Ub-Neo- <i>frt</i> .
	25	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' del casete <i>frt</i> -Ub-Hyg- <i>frt</i> y el extremo 5' de la inserción TCRV β 1-TCRV β 12-2 humana.
6192	26	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la secuencia de ratón cercana al gen C β 2 de ratón y el extremo 5' de la secuencia del exón 2 de TCRBV30 humano.
	27	Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la secuencia del exón 1 de TCRBV30 humano y el extremo 5' de la secuencia de ratón posterior al locus TCR β .

Los segmentos de la región TCR β variable humana están numerados en según la base de datos IMGT. Se han incluido al menos 100 pb en cada unión (al menos 50 pb desde cada extremo) en el Listado de secuencias.

Específicamente, El ADN del clon BAC RP23-153p19 (Invitrogen) de ratón se modificó mediante recombinación homóloga y se usó como vector de direccionamiento (MAID 1544) para sustituir una región de 17 kb (que incluye

TCRBV30) justo antes de la agrupación del gen del tripsinógeno en dirección 3' en el locus TCR β endógeno de ratón con un casete PGK-neo seguido por un sitio *loxP* (Fig. 8A). El ADN del clon BAC RP23-461h15 (Invitrogen) de ratón se modificó mediante recombinación homóloga y se usó como vector de direccionamiento (MAID 1542) para sustituir una región de 8355 pb (incluidos TCRBV2 y TCRBV3) después de la agrupación del gen del tripsinógeno en dirección 5' en el locus TCR β endógeno de ratón con un casete Ub-higromicina seguido por un sitio *loxP*. Las células ES que tienen un cromosoma con doble direccionamiento (es decir, un locus TCR β endógeno de ratón individual que es diana específica de ambos vectores de direccionamiento) se confirmaron por métodos de cariotipado y cribado (por ejemplo, TAQMAN™) conocidos en la materia. Las células ES modificadas se trataron con CRE recombinasa, mediando la delección de las regiones comprendidas entre los sitios *loxP* 5' y 3' (es decir, la región que consiste en el locus TCR β endógeno de ratón de TCRBV2 a TCRBV30) y dejando detrás solamente un sitio *loxP*, el casete de higromicina, y las secuencias constantes y potenciadoras de los TCRBD, TCRBJ, de ratón. Un TCRV β de ratón se dejó antes de la agrupación del gen del tripsinógeno en dirección 5', y un TCRB β de ratón se dejó después de E β de ratón, tal como se indica en la Fig. 8A.

El primer vector de direccionamiento humano de TCR β tenía 125.781 pb de ADN humano procedente del clon BAC CTD2559j2 (Invitrogen) que contenía los 14 primeros segmentos génicos de TCR β V humano consecutivos (TRBV18-TRBV29-1). Este BAC se modificó mediante recombinación homóloga para contener un sitio *AsiI* en dirección 5' y un sitio *Ascl* en dirección 3' para la unión de brazos de homología de ratón en las direcciones 5' y 3'. Se usaron dos brazos de homología diferentes para la unión de este fragmento humano: un conjunto de brazos de homología contenía la secuencia de TCR β endógeno que rodea los genes del tripsinógeno de ratón posteriores derivados del clon BAC RP23-153p19 BAC y otro conjunto contenía la secuencia de TCR β endógeno que rodea los genes del tripsinógeno de ratón anteriores derivados del clon BAC RP23-461h15. Este BAC ratón-ser humano quimérico se usó como vector de direccionamiento (MAID 1625) para fabricar una inserción inicial de los segmentos génicos de TCR β humano junto con un casete anterior *frt*-ub-neomicina-*frt* en el locus TCR β de ratón, y dio como resultado un mini-locus TCR β humano que contenía 14 TCR β V humanos (8 funcionales) (Fig. 8B). Las secuencias de los ácidos nucleicos de unión (SEQ ID NOs: 14-16) del vector de direccionamiento MAID 1625 se describen en la Tabla 3.

Para sustituir los segmentos D y J de TCR β de ratón por los segmentos D y J de TCR β humano, El ADN de clon BAC RP23-302p18 (Invitrogen) de ratón y del clon BAC RP11-701D14 (Invitrogen) humano se modificó mediante recombinación homóloga y se usó como vector de direccionamiento (MAID 1715) en las células ES que contenían el mini-locus TCR β V anteriormente descrito (es decir, MAID 1625). Esta modificación sustituyó una región de ~18540 pb (desde 100 pb antes de la poliA de los genes del tripsinógeno en dirección 3' hasta 100 pb después de los segmentos J del clúster D2 que incluía TCRBD1-J1 de ratón, la región constante 1 de ratón, y TCRBD2-J2 de ratón) en el locus TCR β endógeno de ratón por ~25425 pb de la secuencia que contenía TCRBD1-J1 humano, el casete *loxP* Ub-higromicina-*loxP*, la región constante 1 de ratón, TCRBD2-J2 (Fig. 8C(i) humano). Las células ES que tienen un cromosoma con doble direccionamiento (es decir, un locus TCR β endógeno de ratón individual que es diana específica de ambos vectores de direccionamiento) se confirmaron por métodos de cariotipado y cribado (por ejemplo, TAQMAN™) conocidos en la materia. Las células ES modificadas se trataron con CRE recombinasa, mediando de esta forma la delección del casete de higromicina dejando detrás solamente un sitio *loxP* individual después de los segmentos J humanos del clúster D1J (Fig. 8C(ii)). Las secuencias de los ácidos nucleicos de unión (SEQ ID NOs: 17-21) del vector de direccionamiento MAID 1715 se describen en la Tabla 3.

Posteriormente, se preparó una serie de vectores de direccionamiento humanos que utilizaron el mismo brazo de ratón en dirección 5' que contenía la secuencia de TCR β endógeno que rodea los genes de tripsinógeno de ratón anteriores derivados del clon BAC RP23-461h15 con casete de selección alternante.

Para generar un mini-locus TCR β humano que contiene un total de 40 segmentos génicos TCR β V humanos (30 funcionales) y los segmentos D y J de TCR β humano, el ADN derivado de los clones BAC RP11-134h14 y RP11-785k24 (Invitrogen) humanos se modificó mediante recombinación homóloga y se combinó en un vector de direccionamiento (MAID 1791) usando recombinación homóloga bacteriana convencional, digestión con restricción/ligadura, y otras técnicas de clonación. La introducción del vector de direccionamiento MAID 1791 dio como resultado la adición de 198.172 pb de ADN humano que contenía los siguientes 26 segmentos génicos (22 funcionales) consecutivos de TCR β V humano (TRBV6-5 to TRBV17) y un casete *frt*-ub-higromicina-*frt* en dirección 5'. El locus TCR β resultante contenía un casete 5' *frt*-ub-higromicina-*frt* junto con un total de 40 segmentos génicos de TCR β V humano (30 funcionales) y los segmentos D y J de TCR β unidos operativamente a genes de la región constante y potenciadores de TCR β de ratón (Fig. 8D). Las secuencias de los ácidos nucleicos de unión (SEQ ID NOs: 22 y 23) del vector de direccionamiento MAID 1791 se describen en la Tabla 3.

Para generar un mini-locus TCR β humano que contiene un total de 66 segmentos génicos TCR β V humanos (47 funcionales) y los segmentos D y J de TCR β humano, el ADN derivado del clon BAC RP11-902B7 humano (Invitrogen) se modificó mediante recombinación homóloga y se usó como vector de direccionamiento (MAID 1792). Esto añadió 159.742 pb de ADN humano que contenían los siguientes 26 segmentos génicos (17 funcionales) consecutivos de TCR α V humano (TRBV1 a TRBV12-2) y un casete de *loxP*-ub-neomicina-*loxP* en la dirección 5'. El locus TCR β resultante contenía un casete 5' *frt*-ub-neomicina-*frt* junto con un total de 66 segmentos génicos de TCR β V humano (47 funcionales) y los segmentos D y J de TCR β unidos operativamente a genes de la región constante y potenciadores de TCR β de ratón. (Fig. 8E). Las secuencias de los ácidos nucleicos de unión (SEQ ID NOs: 24 y 25) del vector de

direccionamiento MAID 1792 se describen en la Tabla 3.

En cualquiera de las etapas anteriores, los casetes de selección se eliminaron por delección con Cre o Flp recombinasa. Por ejemplo, como se representa gráficamente en la Fig. 7, MAID 1716 corresponde a MAID 1715 con delección del casete de higromicina.

Finalmente, se generó un mini-locus TCR β humano que contiene un total de 67 segmentos génicos TCR β V humanos (48 funcionales) y los segmentos D y J de TCR β humano se generó. TCRBV31 de ratón está situado a ~9,4 kb en dirección 3' de TCRBC2 (segunda secuencia de la región constante de TCRB) y está en orientación opuesta a otros segmentos de TCRBV. El segmento V humano equivalente es TCRBV30, que está situado en una posición similar del locus TCRB humano.

Para humanizar TCRBV31, el clon BAC de ratón que contiene TCRBV31 de ratón, se modificó mediante recombinación homóloga bacteriana para preparar LTVEC MAID 6192 (Fig. 8F). La totalidad de la región codificante, que comienza en el codón de inicio del exón 1, el intrón, la UTR en dirección 3', y las secuencias señal de recombinación (RSS) de TCRBV31 se sustituyeron por las secuencias del TCRBV30 homólogo humano. La UTR en dirección 5' se mantuvo como la secuencia de ratón. Para la selección, se introdujo un casete de autodelección (lox2372-Promotor de ubiquitina-Hyg-PGKpoliA-Promotor de protamina-Cre-SV40polyA-lox2372) en el intrón (72 pb en dirección 3' del exón, 1.289 pb en dirección 5' del exón 2). Por simplicidad, Las Figs. 7 y 8 representan gráficamente el casete de selección en dirección 3' del hTCRBV30, aunque se genomanipuló para situarse en el intrón entre el exón 1 y el exón 2 del gen hTCRBV30. El promotor de la protamina que impulsa la expresión de Cre se transcribió exclusivamente en espermáticas postmeióticas, de forma que el casete se "autodeleciona" en la generación F1 de ratones.

Las secuencias de los ácidos nucleicos de unión (SEQ ID NOS: 26 y 27) del vector de direccionamiento MAID 6192 se describen en la Tabla 3. El ADN de MAID 6192 se electroporó en células ES MAID1792. Los clones de células ES se seleccionaron según la resistencia a higromicina y se cribaron según la pérdida del alelo TCRB31 de ratón y la obtención del alelo TCRB30 humano.

Se utilizó una estrategia de genomanipulación similar para deleccionar opcionalmente el segmento V de TCR β en dirección 5' restante.

Ejemplo 4: Generación de ratones TCR α /TCR β

En cada etapa de humanización progresiva de los loci TCR α y TCR β , los ratones homocigóticos para el locus TCR α variable humanizado se pueden reproducir con ratones homocigóticos para el locus TCR β variable humanizado para formar una progenie que comprende locus TCR α y TCR β variables humanizados. La progenie se reproduce con homocigosidad con respecto a los locus TCR α y TCR β variables humanizados.

En una realización, los ratones homocigóticos para el locus TCR α variable humanizado que comprenden 8 V α humanos y 61 J α humanos (MAID 1767; "1767 HO") se reprodujeron con ratones homocigóticos para el locus TCR β variable humanizado que comprenden 14 V β humanos, 2 D β humanos, y 14 J β humanos (MAID 1716; "1716 HO"). La progenie se reproduce con homocigosidad con respecto a ambos loci humanizados.

Ejemplo 5: Producción de linfocitos T esplénicos en ratones homocigóticos para los locus TCR α y/o TCR β humanizados

Bazos de ratones silvestres (WT); ratones con el locus TCR α de ratón eliminado ("MAID1540", véase la Fig. 3); ratones homocigóticos para el locus TCR α humano ("MAID 1767", véase la Fig. 3); ratones con segmentos V de TCR β eliminados con la excepción de dos segmentos V de ratón remanentes ("MAID1545", véase la Fig. 7); ratones homocigóticos para el locus TCR β humano, que también comprenden los dos segmentos V de ratón remanentes ("MAID 1716", véase la Fig. 7); y ratones homocigóticos para ambos loci TCR α y TCR β humanos, donde el locus TCR β comprende también los dos segmentos V de ratón remanentes ("MAID 1767 1716") se perfundieron con Colagenasa D (Roche Bioscience) y los eritrocitos se lisaron con tampón de lisis ACK, seguido por lavado con medio RPMI.

Los esplenocitos de un único animal representativo WT, MAID 1540, 1767, 1545, 1716, y 1716 1767 se evaluaron mediante citometría de flujo. En resumen, se prepararon suspensiones celulares con métodos convencionales. 1×10^6 células se incubaron con anticuerpo CD16/CD32 dirigido contra IgG de ratón (2.4G2 GD) en hielo durante 10 minutos y se tiñeron con el cóctel de anticuerpos adecuado durante 30 minutos sobre hielo. Después de la tinción, las células se lavaron y a continuación se fijaron en formaldehído al 2 %. La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo LSRII/Cantoll/ISRFortessa y se analizaron con FlowJo.

Para teñir los esplenocitos, se usó un aPC dirigido contra FITC-CD3 (17A2, BD) de ratón. Como se demuestra en la Fig. 9, los ratones con segmentos TCR humanos fueron capaces de producir cantidades significativas de linfocitos T CD3+, mientras que los machos con un locus TCR α de ratón no lo hicieron. Los ratones con delección del locus TCR β también produjeron linfocitos T CD3+, supuestamente debido al uso del segmento V de ratón en 3' remanente (véase más adelante).

Ejemplo 6: Desarrollo de linfocitos T tímicos en ratones homocigóticos para los locus TCR α y/o TCR β humanizados

5 Para determinar si ratones homocigóticos para los locus TCR α y/o TCR β humanizados presentan un desarrollo de linfocitos T normal en el timo, esplenocitos procedentes de cuatro de cada uno de los animales WT 1767 HO, 1716 HO, y 1716 HO 1767 HO emparejados por edad (7-10 semanas de edad) se usaron en citometría de flujo para evaluar la producción de linfocitos T en diferentes estadios del desarrollo, así como para evaluar la frecuencia y la cantidad absoluta de cada uno de los linfocitos T DN, DP, CD4 SP, y CD8 SP.

10 Las determinaciones del tipo celular se realizaron según la presencia de marcadores de la superficie celular CD4, CD8, CD44, y CD25 como se resume en la Tabla 1. La correlación entre la designación del tipo celular y la expresión de los marcadores de la superficie celular en el timo es la siguiente: linfocitos doble negativo (DN) (CD4-CD8-), linfocitos doble positivo (DP) (CD4+ CD8+), linfocitos CD4 simple positivo (CD4+ CD8-), linfocitos CD8 simple positivo (CD4-CD8+), linfocitos doble negativo 1/DN1 (CD4-CD8-, CD25-CD44+), linfocitos doble negativo 2/DN2 (CD4-CD8-, CD25+ CD44+), linfocitos doble negativo 3/DN3 (CD4-CD8-, CD25+ CD44-), linfocitos doble negativo 4/DN4 (CD4-CD8-, CD25-CD44-).

20 Los timocitos se evaluaron mediante citometría de flujo. En resumen, se prepararon suspensiones celulares con métodos convencionales. La citometría de flujo se realizó como se describe en el Ejemplo 5. Los anticuerpos utilizados fueron: anticuerpo dirigido PE-CD44 de ratón (IM7, BioLegend), PeCy7-CD25 (PC61, BioLegend), APC-H7-CD8a (53-6.7, BD), y APC-CD4 (GK1.5, eBioscience).

25 Como se muestra en las Figs. 10 y 11, los ratones homocigóticos para TCR α , TCR β , humanizados y ambos TCR α y TCR β humanizados fueron capaces de producir linfocitos T DN1, DN2, DN3, DN4, DP, CD4 SP, y CD8 SP, lo que indica que linfocitos T producidos a partir de los loci humanizados son capaces de realizar el desarrollo de linfocitos T en el timo.

Ejemplo 7: Diferenciación de linfocitos T esplénicos en ratones homocigóticos para los locus TCR α y/o TCR β humanizados

30 Para determinar si ratones homocigóticos para los locus TCR α y/o TCR β humanizados presentan una diferenciación de linfocitos T normal en el timo en la periferia (por ejemplo, bazo), de cuatro de cada uno de los animales WT 1767 HO, 1716 HO, y 1716 HO 1767 HO emparejados por edad (7-10 semanas de edad) se usaron en citometría de flujo para evaluar la producción de diferentes tipos de linfocitos T en el bazo (CD3+, CD4+, CD8+, T no expuestos, Tcm, y Teff/em), así como para evaluar la cantidad absoluta de cada tipos de linfocitos T en el bazo.

40 Las determinaciones del tipo celular se realizaron según la presencia de marcadores de la superficial celular de CD19 (marcador de linfocitos B), CD3 (marcador de linfocitos T), CD4, CD8, CD44, y CD62L (L-selectina). La correlación entre la designación del tipo celular y la expresión de los marcadores de la superficie celular en el bazo es la siguiente: linfocitos T (CD3+), linfocitos T CD4 (CD3+ CD4+ CD8-), linfocitos T CD8 (CD3+ CD4-CD8+), linfocitos T CD4 efectores/efectores de memoria (CD3+ CD4+ CD8-CD62L-CD44+), linfocitos T CD4 de memoria central (CD3+ CD4+ CD8-CD62L+ CD44+), linfocitos T CD4 no expuestos (CD3+ CD4+ CD8-CD62L+ CD44-), linfocitos T CD8 efectores/efectores de memoria (CD3+ CD4-CD8+ CD62L-CD44+), linfocitos T CD8 de memoria central (CD3+ CD4-CD8+ CD62L+ CD44+), linfocitos T CD8 no expuestos (CD3+ CD4-CD8+ CD62L+ CD44-).

50 Los esplenocitos se evaluaron mediante citometría de flujo. En resumen, se prepararon suspensiones celulares con métodos convencionales. La citometría de flujo se realizó como se describe en el Ejemplo 5. Los anticuerpos utilizados fueron: anticuerpo dirigido FITC-CD3 de ratón (17A2, BD), PE-CD44 (IM7, BioLegend), PerCP-Cy5.5-CD62L (Mel-14, BioLegend), APC-H7-CD8a (53-6.7, BD), APC-CD4 (GK1.5, eBioscience), y V450-CD19 (1D3, BD).

55 Tal como se muestra en las Figs. 12-14, los linfocitos T del bazo de ratones homocigóticos para TCR α , TCR β humanizados y ambos TCR α y TCR β humanizados fueron capaces de experimentar la diferenciación de linfocitos T, y ambos tipos de linfocitos T CD4+ y CD8+ T estaban presentes. Además, se detectaron linfocitos T de memoria en los bazos de los ratones estudiados.

Ejemplo 8: Utilización de segmentos V humanos en ratones TCR humanizados

60 La expresión de segmentos V de TCR β se evaluó en las proteínas y el ARN usando citometría de flujo y PCR en tiempo real TAQMAN™, respectivamente, en ratones homocigóticos para el locus TCR β humanizado (1716 HO) y ratones homocigóticos para ambos locus TCR β y TCR α humanizados (1716 HO 1767 HO).

65 Para la citometría de flujo, se prepararon los linfocitos T esplénicos, y su análisis se realizó como se describe en el Ejemplo 5. Para la citometría de flujo, el kit de la gama TCR β (IOTEST® Beta Mark, Beckman Coulter) fue el utilizado. El kit contiene anticuerpos las variantes humanas de numerosos TCRBV humanos, por ejemplo, hTRBV-18, -19, -20, -25, -27, -28, y -29.

Los resultados se resumen en la Fig. 15. Las tablas presentadas en la Fig. 15A (superposición de linfocitos T CD8) y en la Fig 15B (superposición de linfocitos T CD4) demuestran que los linfocitos T esplénicos en ambos ratones 1716 HO y 1716 HO 1767 HO utilizaron numerosos segmentos V de TCR β humano. Los ratones de tipos silvestre se utilizaron como control negativo.

Para la PCR en tiempo real, el ARN total se purificó a partir del bazo y del timo usando MAGMAX™-96 para el kit de aislamiento Microarrays Total RNA (Ambion de Life Technologies) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El ADN genómico se eliminó usando el tampón MAGMAX™TURBO™DNase y TURBO DNase del kit MAGMAX anteriormente citado (Ambion by Life Technologies). El ARNm (hasta 2,5 u) se transcribió de forma inversa a ADNc usando SUPERScript® VILO™ Master Mix (Invitrogen de Life Technologies). El ADNc se diluyó a 2-5 ng/ μ l, y 10-25 ng de ADNc se amplificaron con TAQMAN® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems de Life Technologies) usando el sistema de detección de secuencia ABI 7900HT (Applied Biosystems), usando cebadores y sondas Taqman MGB (Applied Biosystems) o sondas BHQ1/BHQ-Plus (Biosearch Technologies) se representaron gráficamente en la Tabla 4 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La expresión relativa de cada gen se normalizó a la región constante 1 de TCR beta (TRBC1) murino del control.

Tabla 4: Cebadores y sondas utilizados para detectar la expresión del ARN de segmentos V de TCR β y región constante de ratones TCR humanizados mediante la PCR en tiempo real (TAQMAN™)

TRBV	Cebador de sentido directo (5'-3')		Cebador de sentido contrario (5'-3')		Sonda (5'-3')	
	Secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
hTRBV 18	CCGGCGTCATGC AGAA	28	GGGCTGCATCTCAGT CTTGC	29	FAM- CACCTGGTCAGG AGGAGG -MGB	30
hTRBV 19	GGAATCACTCAG TCCCCAAAG	31	ATTCTGTTCACTC AGGGTCA	32	FAM- TCAGAAAGGAAG GACAGAAAT-MGB	33
hTRBV 20	CGAGCAAGGCGT CGAGAA	34	GGACAAGGTCAGGCT TGCA	35	FAM- ACAAGTTTCTCAT CAACC- MGB	36
hTRBV 24	TGTTACCCAGAC CCCAAGGA	37	TCTGAGAACATTCCA GCATAATCCT	38	FAM- TAGGATCACAAAG ACAGGAA - MGB	39
hTRBV 25	TCCCCCTGACCCT GGAGTCT	40	TGCTGGCACAGAGGT ACTGAGA	41	FAM- CAGGCCCTCACAT AC- MGB	42
hTRBV 27	AAGCCCAAGTGA CCCAGAA	43	ATTCTGAGAAACAAGT CACTGTTAACTTC	44	FAM- CTCATCACAGTGA CTGGAA- MGB	45

(continuación)

TRBV	Cebador de sentido directo (5'-3')		Cebador de sentido contrario (5'-3')		Sonda (5'-3')	
	Secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO	Secuencia	SEQ ID NO
hTRBV 28	GTGAAAGTAACC CAGAGCTCGAG	46	ATCCTGGACACATTC CAGAAAAAC	47	FAM- ATATCTAGTCAAA AGGACGGGA-MGB	48
hTRBV 29	TGTCATTGACAA GTTTCCCATCAG	49	TGCTGTCTTTCAGGGC TCATG	50	FAM- TCAACTCTGACTG TGAGCA- MGB	51
mTRBC 1	AGCCGCCTGAGG GTCTCT	52	GCCACTTGTCTCCTCTCT CTGAAAG	53	FAM- TACCTTCTGGCAC AATCCTCGCA-BHQ	54

Como se demuestra en las Figs. 16A-B, los ratones homocigóticos para el locus TCR β humanizado (1716 HO) y ratones homocigóticos para ambos locus TCR β y TCR α humanizados (1716 HO 1767 HO) mostraron expresión de ARN de diferentes segmentos de TCR β humano tanto en el timo como en el bazo. Los ratones también mostraron expresión de ARN de segmentos TRBV-1 y TRBV-31 de ratón (no se muestran los datos), pero no se detectó ninguna proteína TRBV-1 mediante citometría de flujo (no se muestran los datos).

El segmento TRBV-31 de ratón se sustituyó por el segmento TRBV-30 humano como se demuestra en la Fig. 8F, y los ratones se generaron a partir de células ES MAID 6192 ES como se describe en el presente documento. Los bazos y timos de los animales homocigóticos resultantes se analizaron para determinar la utilización de segmentos V β humanos, incluidos TRBV-30, mediante citometría de flujo y/o PCR en tiempo real como se describe en el presente documento. El segmento mTRBV-1 también puede estar eliminado.

Ejemplo 9: Desarrollo de linfocitos T en ratones homocigóticos para 23 segmentos V α de TCR humano

Los ratones TCR α homocigóticos humanizados caracterizados en los ejemplos anteriores contenían 8 segmentos V α humanos y 61 segmentos J α humanos (1767 HO, véase la Fig. 3). Los ratones TCR α homocigóticos humanizados que comprenden 23 segmentos V α humanos y 61 segmentos J α humanos (1979 HO, véase la Fig. 3) se sometieron a ensayo para determinar su capacidad de generar linfocitos T CD3+ esplénicos y mostraron desarrollo de linfocitos T en el timo.

Los datos experimentales se obtuvieron mediante citometría de flujo usando los anticuerpos adecuados, como se describe en los ejemplos anteriores. Como se representa gráficamente en la Fig. 17, un ratón homocigótico para 23 segmentos V α humanos y 61 segmentos J α humanos produjo una cantidad significativa de linfocitos T CD3+ esplénicos, y el porcentaje de linfocitos T CD3+ periféricos fue comparable al de los animales silvestres (Fig. 19).

Además, los timocitos de los ratones 1979 HO fueron capaces de experimentar desarrollo de linfocitos T y contenían linfocitos T en etapas DN1, DN2, DN3, DN4, DP, CD4 SP, y CD8 SP (Fig. 18).

Ejemplo 10: Desarrollo y diferenciación de linfocitos T en ratones homocigóticos para obtener un repertorio completo de segmentos de la región variable de TCR α y TCR β humanos

Ratones homocigóticos para un repertorio completo de segmentos de la región variable de TCR α humano (es decir 54 V α humanos y 61 J α humanos) y homocigóticos para un repertorio completo de segmentos de la región variable de TCR β humano 67 V β humanos, 2 D β humanos, y 14 J β humanos), "1771 HO 6192 HO" (véanse las Figs. 3 y 7), se analizaron para determinar su capacidad de producir timocitos que experimenten un desarrollo de linfocitos T normal, produzcan linfocitos T que experimenten una diferenciación de linfocitos T normal en la periferia, y utilicen la gama completa de sus segmentos V α y V β humanos.

Se llevó a cabo citometría de flujo para determinar la presencia de linfocitos T DN1, DN2, DN3, DN4, DP, CD4 SP y CD8 SP en el timo usando anticuerpos dirigidos contra CD4, CD8, CD25, y CD44 de ratón como se ha descrito anteriormente en los Ejemplos 5 y 6. También se realizó citometría de flujo para determinar el número de linfocitos T CD3+ en la periferia, así como para evaluar la diferenciación de linfocitos T en la periferia (por ejemplo, la presencia de linfocitos T efectoras y de memoria en la periferia). El experimento se realizó usando anticuerpos dirigidos contra CD3, CD19, CD4, CD8, CD44, y CD62L de ratón como se ha descrito anteriormente en los Ejemplos 5 y 7.

Finalmente, se realizaron citometría de flujo y/o PCR en tiempo real para determinar si los linfocitos T de los ratones 1771 HO 6192 HO utilizan un repertorio completo de segmentos V de TCR β y TCR α . Para la expresión de proteínas usando citometría de flujo, el kit de la gama TCR β (IOTEST® Beta Mark, Beckman Coulter), que contenía anticuerpos específicos dirigidos contra hTCRBV humano, fue el utilizado (véase el Ejemplo 8). Para la expresión de ARN usando la PCR en tiempo real, los ADNc procedentes de bazos y timos se amplificaron utilizando cebadores de TCR-V humano y sondas Taqman, de acuerdo con las instrucciones del fabricante y como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 8.

Aquellos expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de averiguar usando nada más que la experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. Tales equivalentes pretenden estar abarcados por las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> RATONES CON RECEPTORES DE LINFOCITOS T GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

<130> EAH/FP7329964

<140> EP

<141> 26-10-2012

<150> EP 12784833.1
 <151> 26-10-2012

5 <150> PCT/US2012/062065
 <151> 26-10-2012

10 <150> US 61/700,908
 <151> 14-09-2012

15 <150> US 61/621,198
 <151> 06-04-2012

<150> US 61/552,582
 <151> 28-10-2011

<160> 54

20 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sintético

30 <400> 1

atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaaggg ggtaccgggc 60
 cccccctcga ggtcgacata acttcgtata gcatacatta 100

35 <210> 2
 <211> 108
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sintético

<400> 2

ggccatgcat ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttataccggg gcgatcgcgc 60
 gcttccctct tctaaccact aattcaaaaa ggattgtaag taatgttt 108

45 <210> 3
 <211> 145
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sintético

<400> 3

55 agacagaccc ctaaacacct ccaaattaaa agcggcaaag agataagggt ggagctccac 60
 cgcggtggcg gccgccaccg cgggtggagct cgagggtttcc ggtacttaac aacagagcac 120
 agatttagtg gtgagggact ctctc 145

60 <210> 4
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

5 <400> 4

atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaaggg ggtaccgggc 60
ccccctcga ggtcgacata acttcgtata gcatacatta 100

10 <210> 5
<211> 109
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sintético

<400> 5

ggccatgcat ataacttcgt atagcatata ttatacgaag ttataccggg gcgatcgctc 60
aagcatgcaa gggtaacata tgttatgaga ttatatctca 109

20 <210> 6
<211> 100
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sintético

<400> 6

30 atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaaggg ggtaccggg 60
ccccctcga agaagttcct attccgaagt tcctattctc 100

35 <210> 7
<211> 108
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintético

<400> 7

gttcctattc cgaagttcct attctctaga aagtatagga acttcctagg gcgatcgctc 60
ctctccaggc tcgaattagt attacagttg aggcacgttg tcctcccg 108

45 <210> 8
<211> 100
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Sintético

<400> 8

55 atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaaggg ggtaccgggc 60
ccccctcga ggtcgacata acttcgtata gcatacatta 100

ES 2 858 978 T3

<210> 9
 <211> 108
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Sintético
 <400> 9
 10
 ggccatgcat ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttataccggt gcgatcgccg 60
 cctccatttc cttcatagga aacatgaagt gaatggggct gtgtgtgt 108
 <210> 10
 <211> 100
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintético
 20 <400> 10
 atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaaggg ggtaccgggc 60
 cccccctcga ggtcgacata acttcgtata gcatacatta 100
 25 <210> 11
 <211> 108
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Sintético
 <400> 11
 ggccatgcat ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttataccggt gcgatcgctg 60
 ggagcacggt ccattattat aacaactttc tgaacacaag agggcagt 108
 35 <210> 12
 <211> 100
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintético
 45 <400> 12
 atggagtagt cagaacacac tcttcagaag ggactcctga tttcaaaggg ggtaccgggc 60
 cccccctcga ggtcgacata acttcgtata gcatacatta 100
 50 <210> 13
 <211> 108
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Sintético
 <400> 13

ES 2 858 978 T3

ggccatgcat ataatctcgt atagcataca ttatacgaag ttataccggt gcgatcgctt 60
taagggtgagg aggcaggcaa taccctctct ccaccgcatt ctcaatcc 108

5 <210> 14
<211> 100
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético
<400> 14

gggggggtgg ggtggaggag gagggtagag catctcctct ccttcctctc tggtagcgaa 60
gttcctattc cgaagttcct attctctaga aagtatagga 100

15 <210> 15
<211> 108
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético
<400> 15

25 gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttcctaggg tttcaccggt gcgatcgctt 60
gaatatacta aaaaccactt aattatataat ttgaaagggt ggatgtta 108

30 <210> 16
<211> 108
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

35 <400> 16

ctctctccta cccagctcct ctacacgag cctgaaggcc ctgccaagggt ggcgcgctt 60
tcaaattgtt gttgagttca aagtgggcaa cagaaaagggt ggtgtgag 108

40 <210> 17
<211> 130
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sintético
<400> 17

aataaatagt aaatttctgt agaatacataa tgagggtctag acccccgggc tcgataacta 60
taacggctcct aaggtagcga aatggcgctt aatcaagccc agctcttcat gctgcatttt 120
tatcttcttt 130

50 <210> 18
<211> 100
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Sintético

ES 2 858 978 T3

<400> 18

5 ttgactcggg ggtgcctggg tttgactgca atgatcagtt gctgggaagg accggtataa 60
 cttcgtataa tgtatgctat acgaagttat atgcatggcc 100

<210> 19
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

15 <400> 19

 cgggcgcgcc ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttatgtcgac ataaggtaag 60
 acagagtcgt cccttcccat ctggaaccct ctacctttct 100

20 <210> 20
 <211> 107
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sintético

 <400> 20

 gttgatgaat cataaaagaa gagatattca agaaaaggat ggccacactg cggccgcaga 60
 ggtattcaag gaaaatgcag actcttcacg taagagggat gaggggc 107

30 <210> 21
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sintético

 <400> 21

40 tccccggagt cggaggggtgg accggagctg gaggagctgc cgcggtggcg gccgatgcc 60
 tttcattacc tctttctccg caccgcacat agataaagct 100

45 <210> 22
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sintético

 <400> 22

 ggggggggtgg ggtggaggag gagggtagag catctcctct ccttcctctc tggtagccgaa 60
 gttcctattc cgaagttcct attctctaga aagtatagga 100

55 <210> 23
 <211> 108
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 858 978 T3

<220>
 <223> Sintético

 <400> 23
 5 gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttcctaggg tttcaccggg gcgatcgcgga 60
 agcaattaac tgcccctggg ccagttgcct cctctgataa tgcattgt 108

 <210> 24
 <211> 100
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintético
 15 <400> 24

 ggggggggtgg ggtggaggag gagggtagag catctcctct ccttcctctc tggtagcgaa 60
 gttcctattc cgaagttcct attctctaga aagtatagga 100

 20 <210> 25
 <211> 108
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Sintético

 <400> 25

 gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttcctaggg tttcaccggg gcgatcgcggt 60
 30 tatctagtag acttaattaa ggatcgatcc ggcgcgccaa tagtcatg 108

 <210> 26
 <211> 100
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintético

 40 <400> 26

 gttttccaga cttcaacttg actatcagcc agaaattcag tggcaaacc cccaccagtc 60
 cctaagtga gggccctggg gagtatggtt agggctcagg 100

 <210> 27
 <211> 100
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintético
 50 <400> 27

 caccaccaa agaaagtgcc caggagaagg gcaaggagag agcagagcat agttcaagat 60
 ggtctttgtc taggcttgtc tactctgcac ttgtacttcc 100
 55 <210> 28
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

	<220> <223> Sintético	
5	<400> 28	
	ccggcgatcat gcagaa	16
10	<210> 29 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Sintético	
	<400> 29	
20	gggctgcatc tcagtcttgc	20
25	<210> 30 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintético	
	<400> 30	
35	cacctgggtca ggaggagg	18
40	<210> 31 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sintético	
	<400> 31	
50	ggaatcactc agtccccaaa g	21
55	<210> 32 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Sintético	
	<400> 32	
65	attctgttca caactcaggg tca	23
70	<210> 33 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
75	<220> <223> Sintético	

	<400> 33		
	tcagaaagga aggacagaat		20
5	<210> 34 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Sintético		
	<400> 34		
15	cgagcaaggc gtcgagaa		18
	<210> 35 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Sintético		
25	<400> 35		
	ggacaaggctc aggcttgca		19
	<210> 36 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
30	<220> <223> Sintético		
35	<400> 36		
	acaagtttct catcaacc		18
40	<210> 37 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
45	<220> <223> Sintético		
	<400> 37		
50	tgttaccag accccaagga		20
	<210> 38 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
55	<220> <223> Sintético		
60	<400> 38		
	tctgagaaca ttccagcata atcct		25

5	<210> 39 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
10	<400> 39 taggatcaca aagacaggaa	20
15	<210> 40 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintético <400> 40 tcccctgacc ctggagtct	19
25	<210> 41 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintético <400> 41 tgctggcaca gaggtactga ga	22
35	<210> 42 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Sintético <400> 42 caggccctca catac	15
45	<210> 43 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Sintético <400> 43 aagcccaagt gaccagaa	19
55	<210> 44 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60		

	<220> <223> Sintético		
5	<400> 44		
	attctgagaa caagtcactg ttaacttc		28
10	<210> 45 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
15	<220> <223> Sintético		
	<400> 45		
20	ctcatcacag tgactggaa		19
	<210> 46 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
25	<220> <223> Sintético		
	<400> 46		
30	gtgaaagtaa cccagagctc gag		23
	<210> 47 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
35	<220> <223> Sintético		
40	<400> 47		
	atcctggaca cattccagaa aaac		24
45	<210> 48 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
50	<220> <223> Sintético		
	<400> 48		
55	atatctagtc aaaaggacgg ga		22
	<210> 49 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
60	<220> <223> Sintético		

	<400> 49	
	tgtcattgac aagtttccca tcag	24
5	<210> 50 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintético	
	<400> 50	
15	tgtgtgtcttc agggctcatg	20
	<210> 51 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintético	
25	<400> 51	
	tcaactctga ctgtgagca	19
	<210> 52 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintético	
35	<400> 52	
	agccgcctga gggctctct	18
40	<210> 53 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sintético	
	<400> 53	
50	gccacttgtc ctctctgaa ag	22
	<210> 54 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Sintético	
60	<400> 54	
	taccttctgg cacaatcctc gca	23

REIVINDICACIONES

1. Una célula de roedor aislada que comprende:

al menos un segmento V α de la región variable de linfocitos T humanos sin reorganizar y al menos un segmento J α de la región variable de linfocitos T humanos sin reorganizar unidos operativamente a una secuencia del gen constante de TCR α de roedor en un locus de gen variable de TCR α de roedor endógeno y/o al menos un segmento V β de la región variable de linfocitos T humanos sin reorganizar, al menos un segmento D β de la región variable de linfocitos T humanos sin reorganizar y al menos un segmento J β de la región variable de linfocitos T humanos sin reorganizar unidos operativamente a una secuencia del gen constante de TCR β de roedor en un locus de gen variable de TCR β de roedor endógeno, en donde los segmentos de la región variable de linfocitos T humanos sin reorganizar son capaces de reorganizarse en un linfocito T para formar genes que codifican dominios variables del receptor de linfocitos T humanos que se unen específicamente a un antígeno de interés.

2. La célula de roedor aislada de la reivindicación 1, en donde la célula de roedor comprende una delección seleccionada del grupo que consiste en (a) una delección de todos los segmentos génicos V α endógenos, (b) una delección de todos los segmentos génicos J α endógenos y (c) una combinación de los mismos y/o en donde la célula de roedor comprende una delección seleccionada del grupo que consiste en (a) una delección de todos los segmentos génicos V β endógenos, (b) una delección de todos los segmentos génicos D β endógenos, (c) una delección de todos los segmentos génicos J β endógenos y (d) una combinación de los mismos.

3. La célula de roedor aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la célula es una célula madre embrionaria.

4. Un linfocito T de roedor aislado, que comprende en un locus de gen variable del TCR α endógeno una secuencia V α /J α del TCR humano reorganizada y/o en un locus de gen variable del TCR β endógeno una secuencia V β /D β /J β del TCR humano reorganizada, en donde el linfocito T expresa un receptor de linfocitos T que comprende un dominio variable de TCR α unido operativamente a una región constante de TCR α de roedor y/o un dominio variable de TCR β unido operativamente a una región constante de TCR β de roedor en su superficie celular.

5. El linfocito T de roedor aislado de la reivindicación 4, en donde el linfocito T es un linfocito T CD4+, un linfocito T CD8+, un hibridoma o un cuadroma derivados del linfocito T CD4+ o un hibridoma o un cuadroma derivados del linfocito T CD8+.

6. La célula o el linfocito T de roedor aislados de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el roedor es una rata.

7. La célula o el linfocito T de roedor aislados de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el roedor es un ratón.

8. Un sistema *in vitro* que comprende una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

9. Un complejo celular *in vitro* que comprende una primera célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-7 y una segunda célula, en donde la segunda célula es una célula presentadora de antígenos que expresa una molécula del MHC humana o humanizada.

10. El complejo celular *in vitro* de la reivindicación 9, en donde la segunda célula es una célula humana o una célula de roedor.

11. Un método para producir un roedor modificado genéticamente, que comprende:

modificar un locus de gen variable del TCR α de roedor endógeno para que comprenda al menos un segmento V α de la región variable de linfocitos T humanos sin reorganizar y al menos un segmento J α de la región variable de linfocitos T humanos sin reorganizar unidos operativamente a una secuencia del gen constante de TCR α de roedor, y/o

modificar un locus de gen variable del TCR β de roedor endógeno para que comprenda al menos un segmento V β de la región variable de linfocitos T humanos sin reorganizar, al menos un segmento D β de la región variable de linfocitos T humanos sin reorganizar y al menos un segmento J β de la región variable de linfocitos T humanos sin reorganizar unidos operativamente a una secuencia del gen constante de TCR β de roedor, en donde los segmentos de la región variable de linfocitos T humanos sin reorganizar son capaces de reorganizarse para formar genes que codifican dominios variables del receptor de linfocitos T humanos, incluyendo dominios que se unen específicamente a un antígeno de interés.

12. El método de la reivindicación 11, en donde el roedor comprende una delección seleccionada del grupo que consiste en (a) una delección de todos los segmentos génicos V α endógenos, (b) una delección de todos los segmentos génicos

Ja endógenos y (c) una combinación de los mismos y/o en donde la célula de roedor comprende una delección seleccionada del grupo que consiste en (a) una delección de todos los segmentos génicos V β endógenos, (b) una delección de todos los segmentos génicos D β endógenos, (c) una delección de todos los segmentos génicos J β endógenos y (d) una combinación de los mismos.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11-12, en donde el roedor es una rata.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11-12, en donde el roedor es un ratón.
15. El método de la reivindicación 14, en donde la modificación se realiza en una célula ES individual y la célula ES individual se introduce en un embrión de ratón para producir un ratón.
16. Un método para obtener una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio variable de TCR humano, que comprende:
 - determinar una secuencia de ácido nucleico de una región variable de TCR humana expresada por la célula de roedor aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 4-7.
17. Un método para producir un receptor de linfocitos T, que comprende:
 - obtener una célula de roedor aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 4-7,
 - aislar una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un dominio variable de TCR humano expresada por la célula de roedor aislada,
 - clonar la secuencia de ácido nucleico en una construcción de nucleótido y expresar dicho receptor de linfocitos T en una célula.

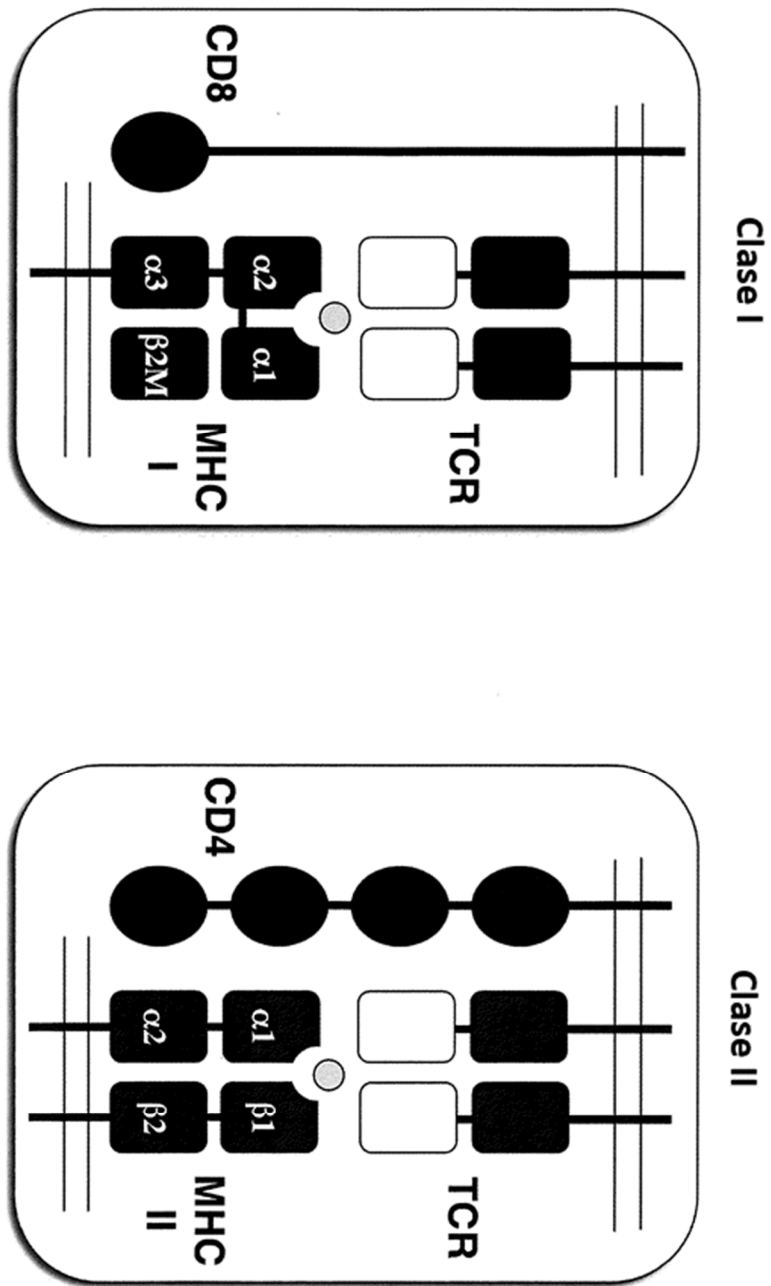


FIG. 1

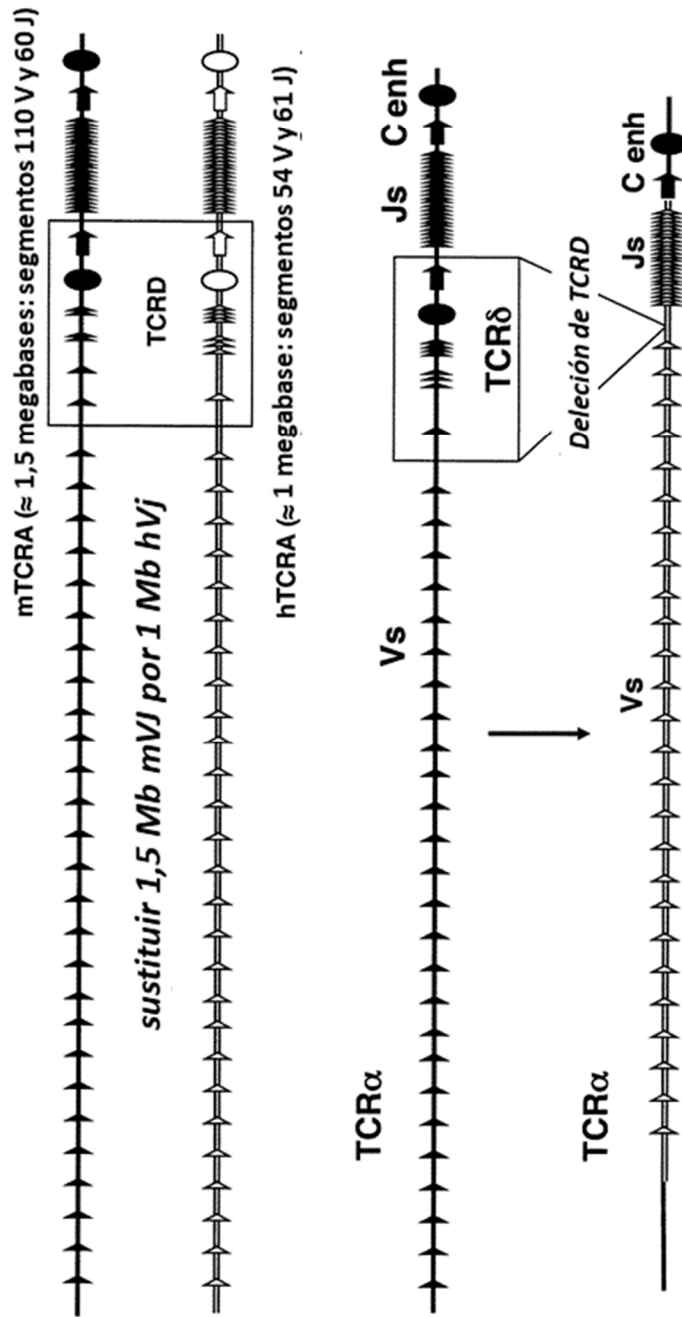


FIG. 2

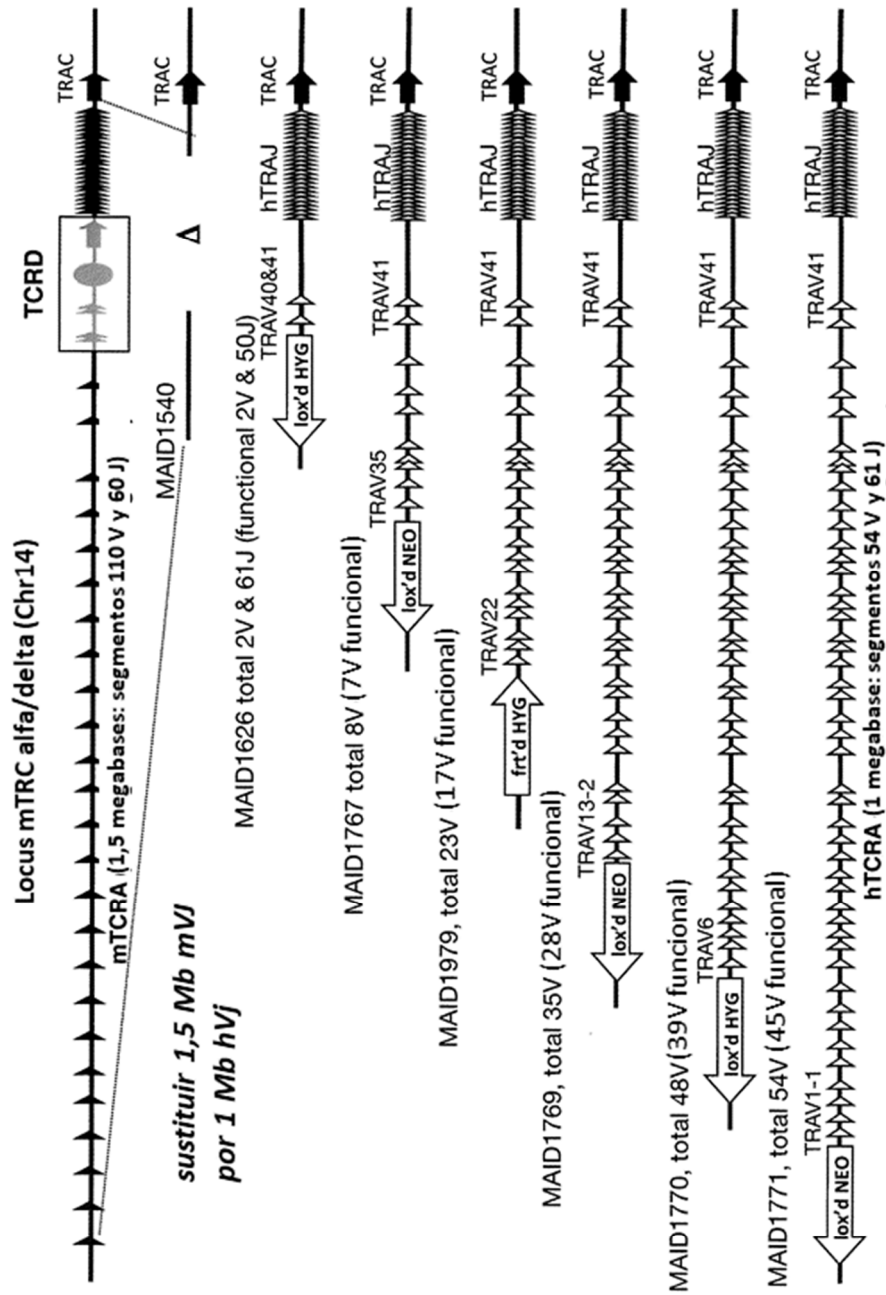


FIG. 3

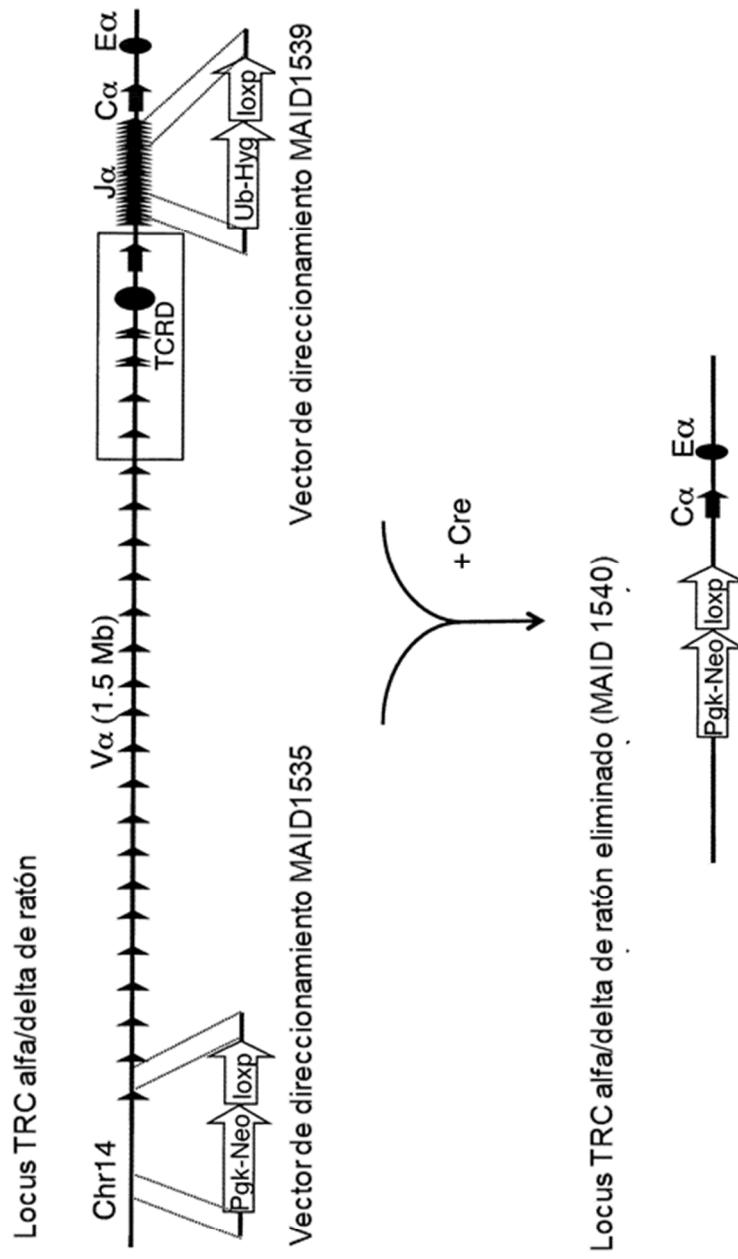


FIG. 4A

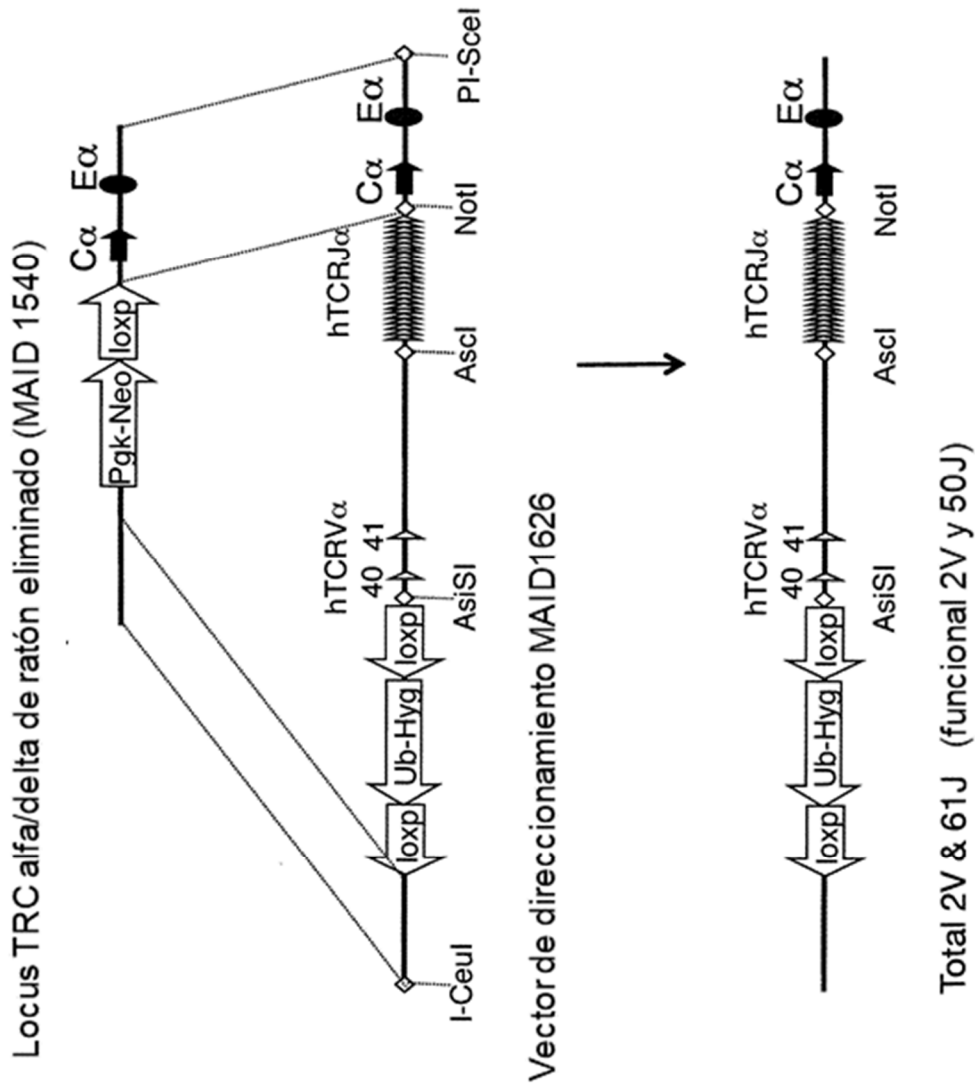


FIG. 4B

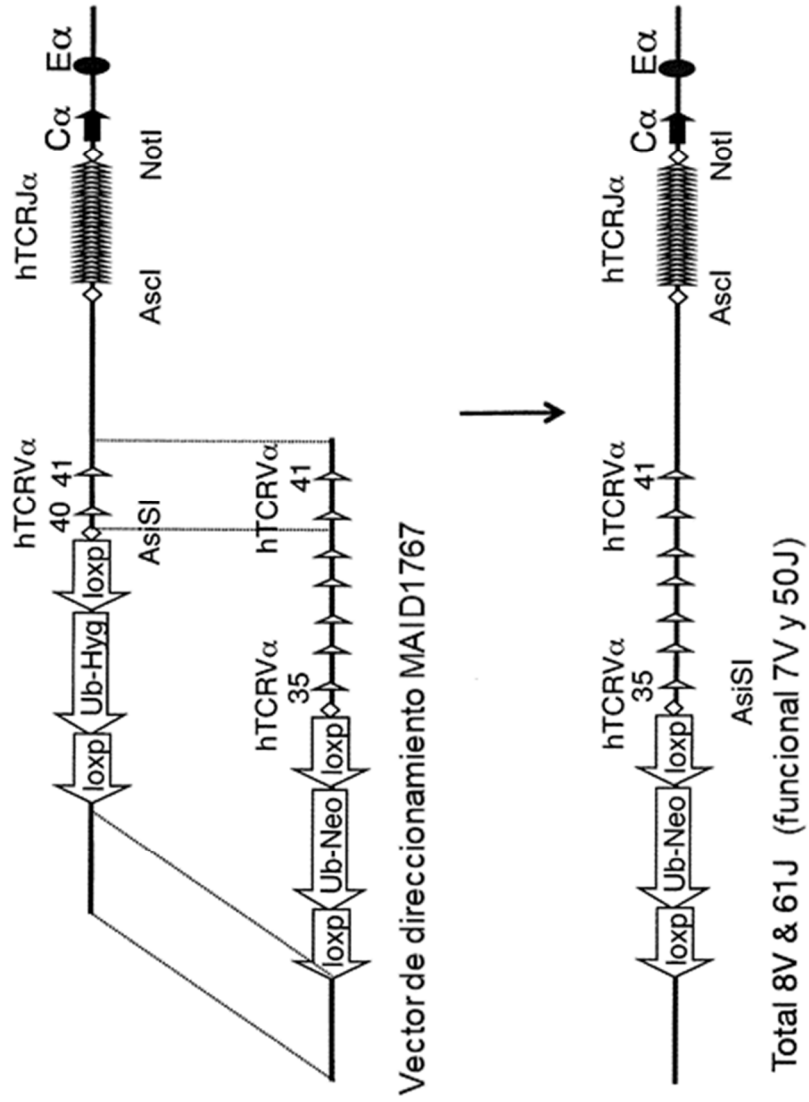


FIG. 4C

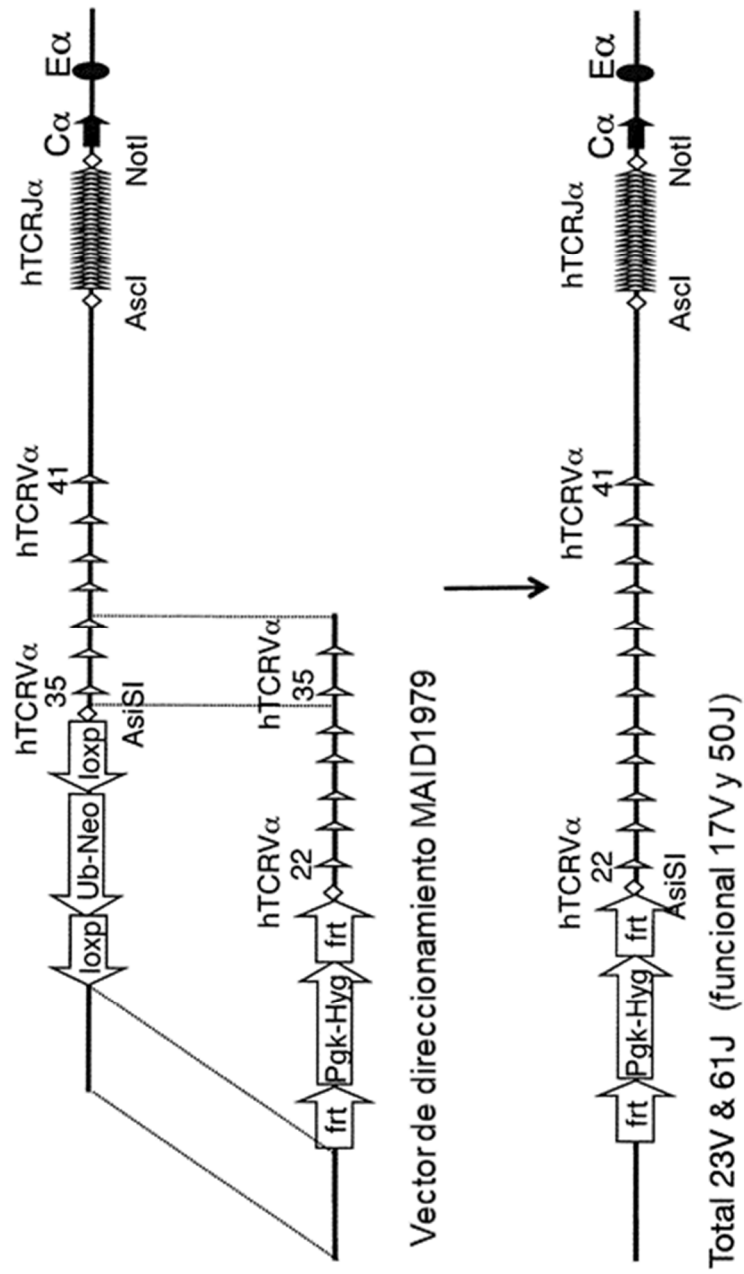


FIG. 4D

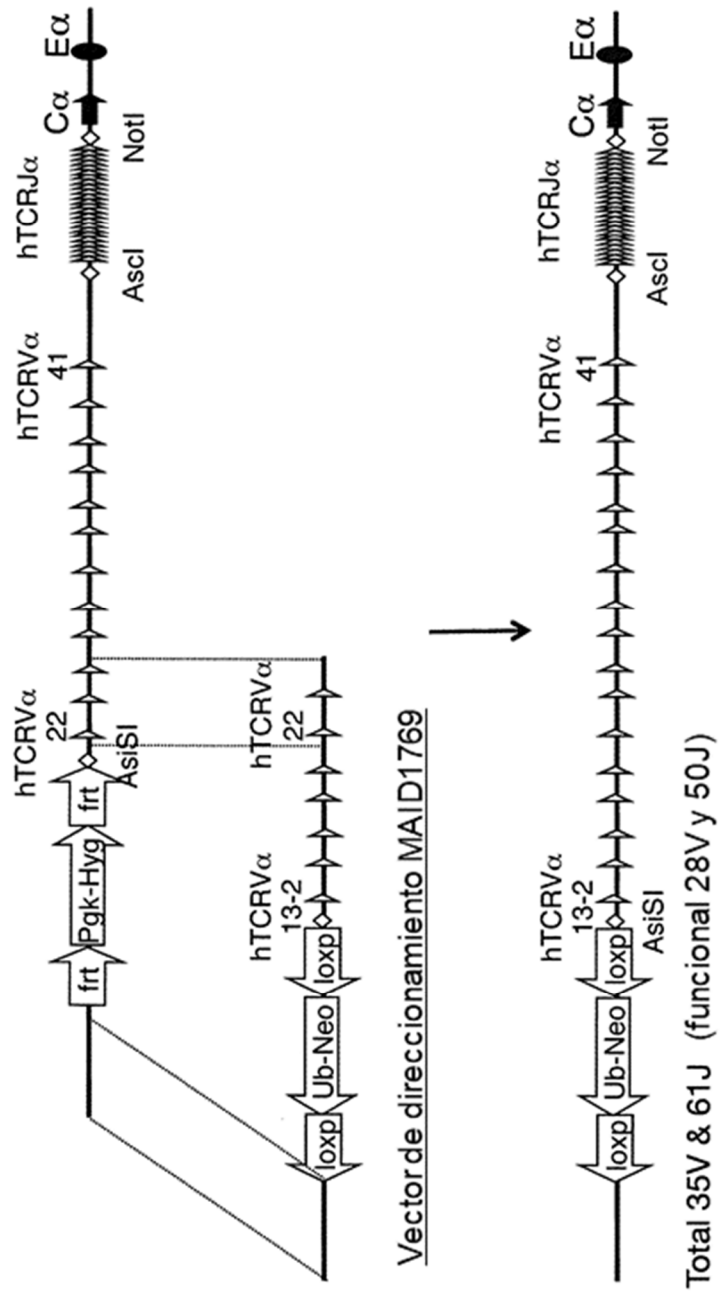


FIG. 4E

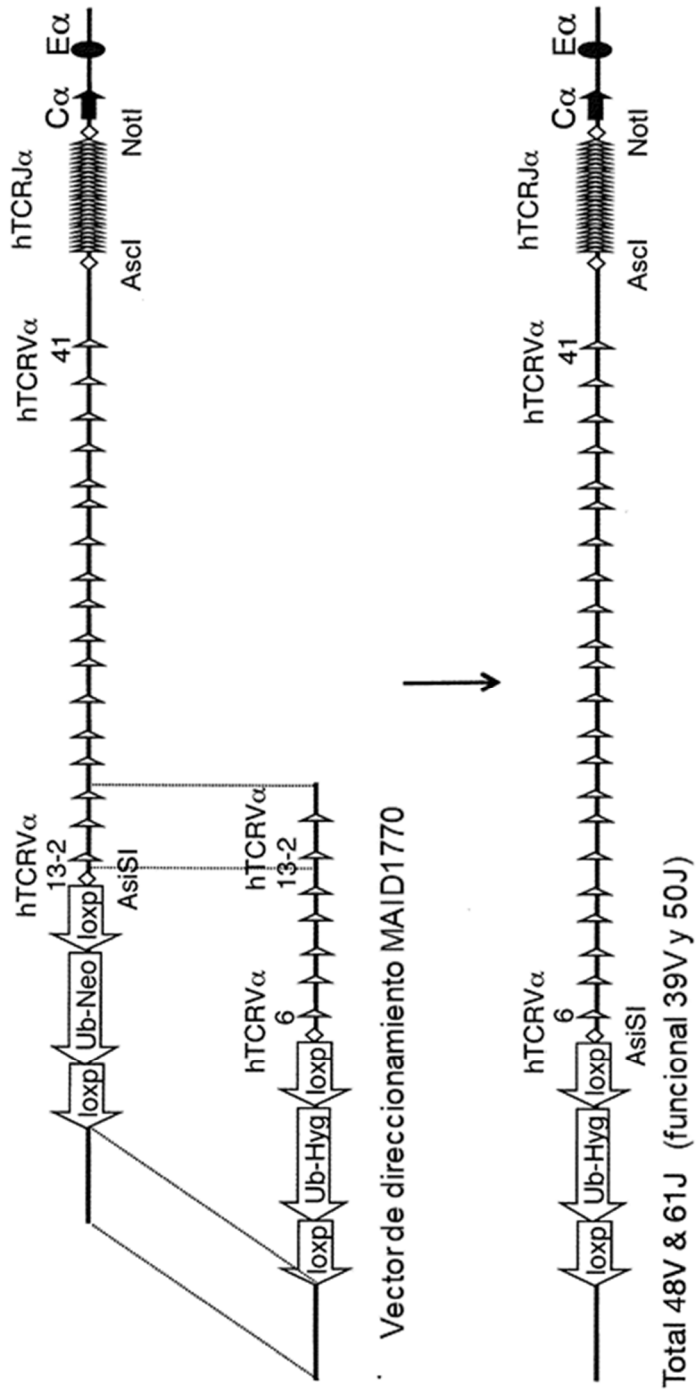


FIG. 4F

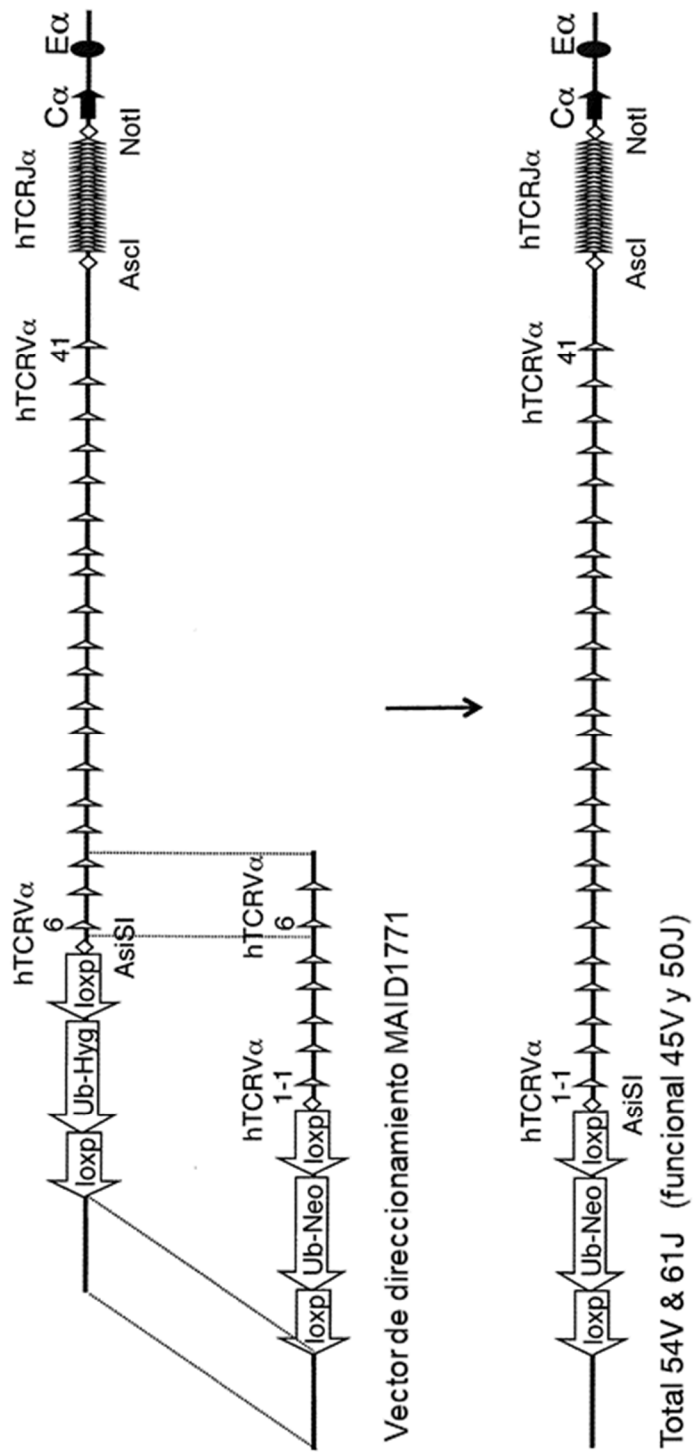


FIG. 4G

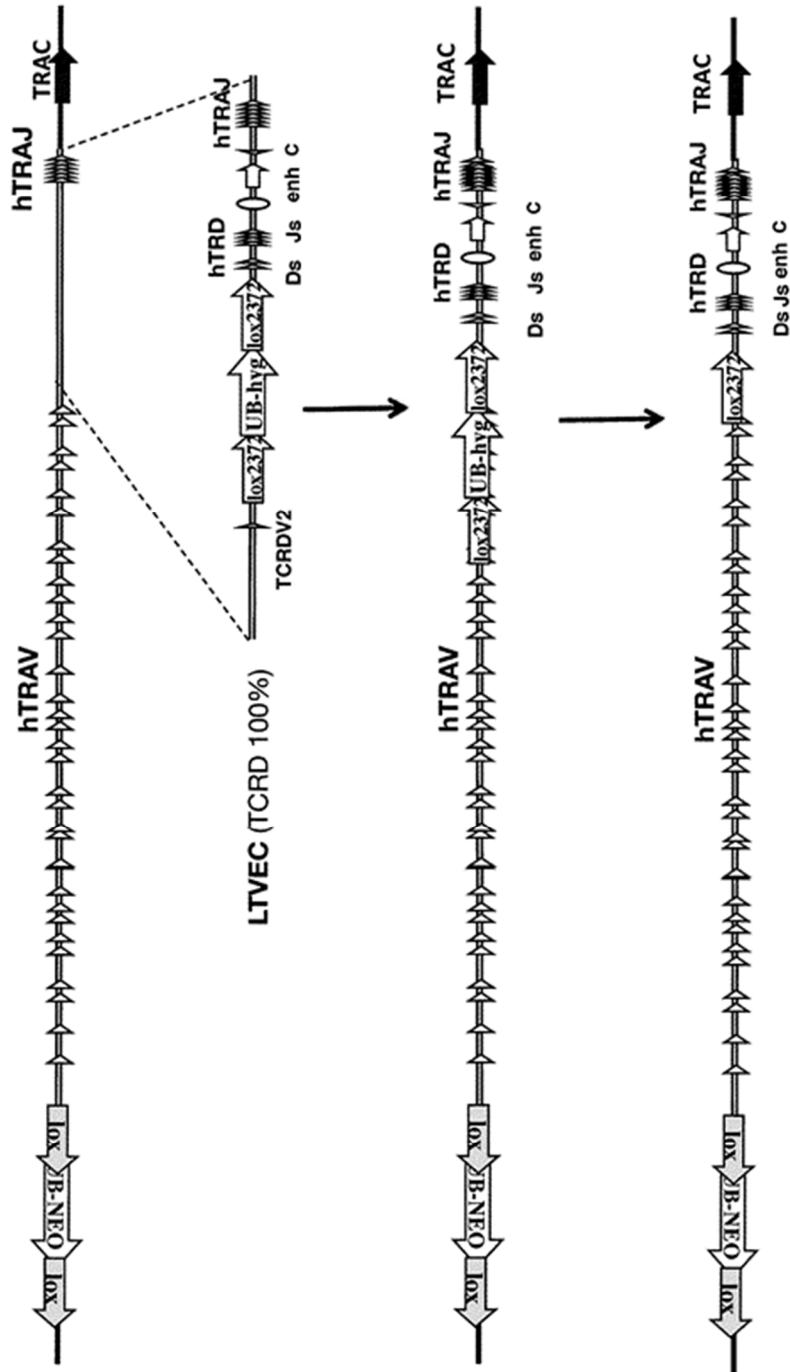


FIG. 5

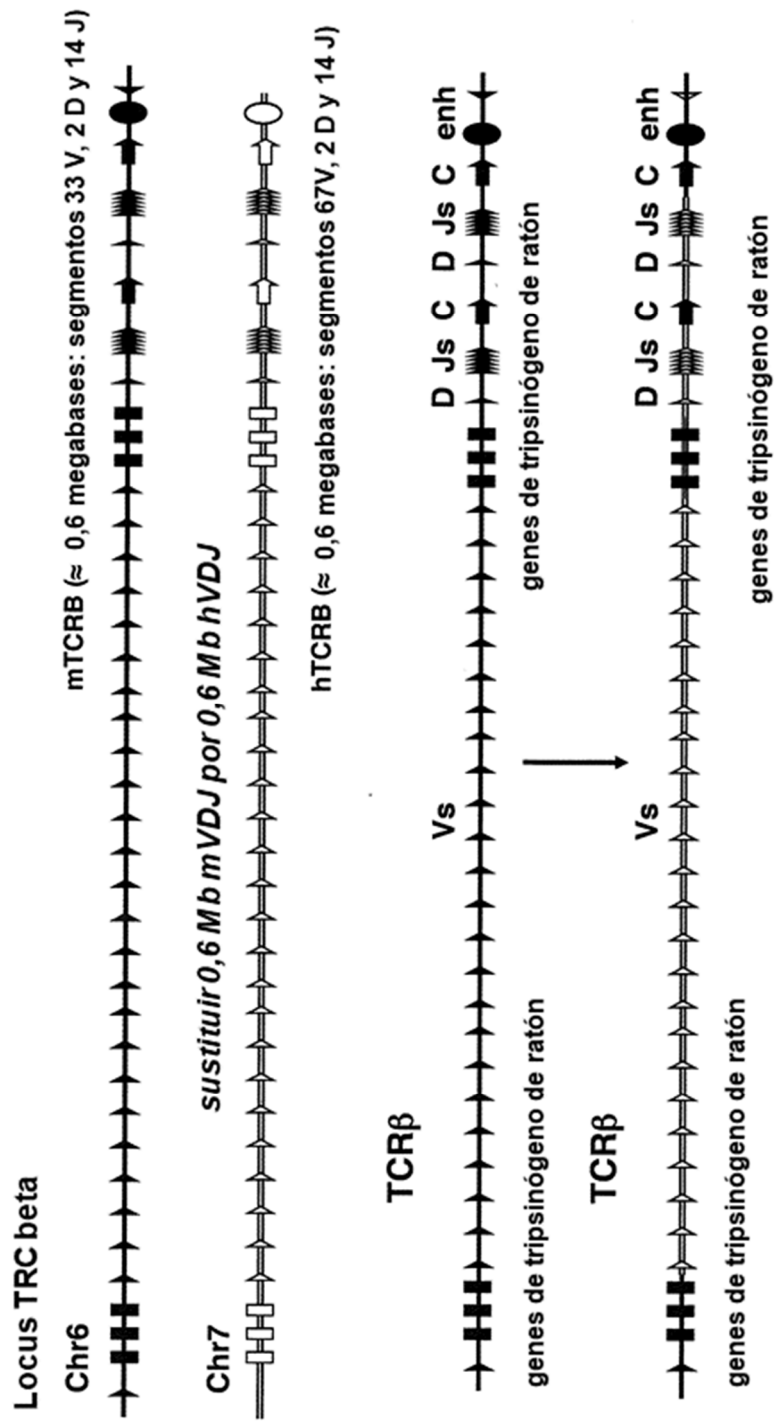


FIG. 6

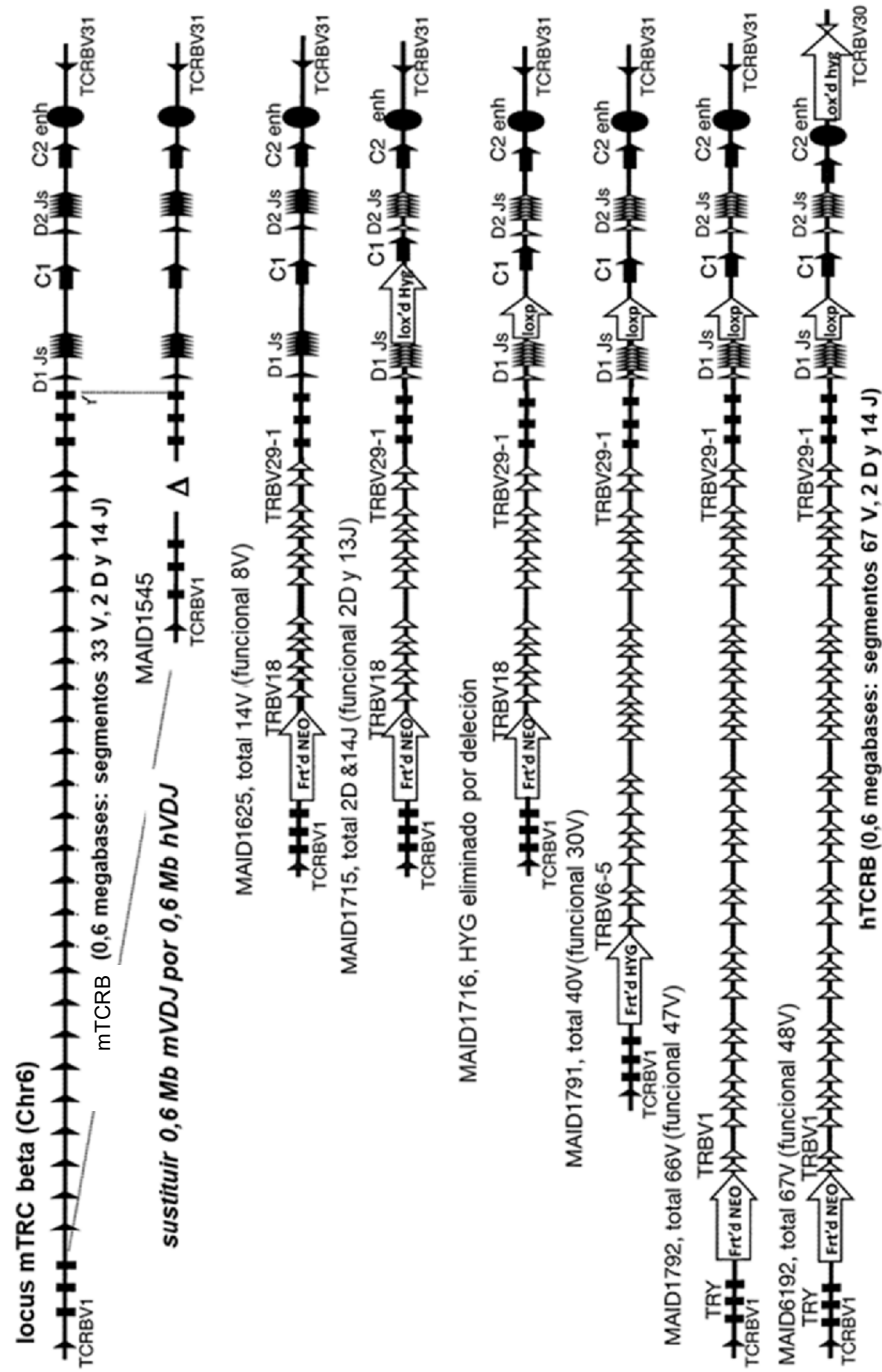


FIG. 7

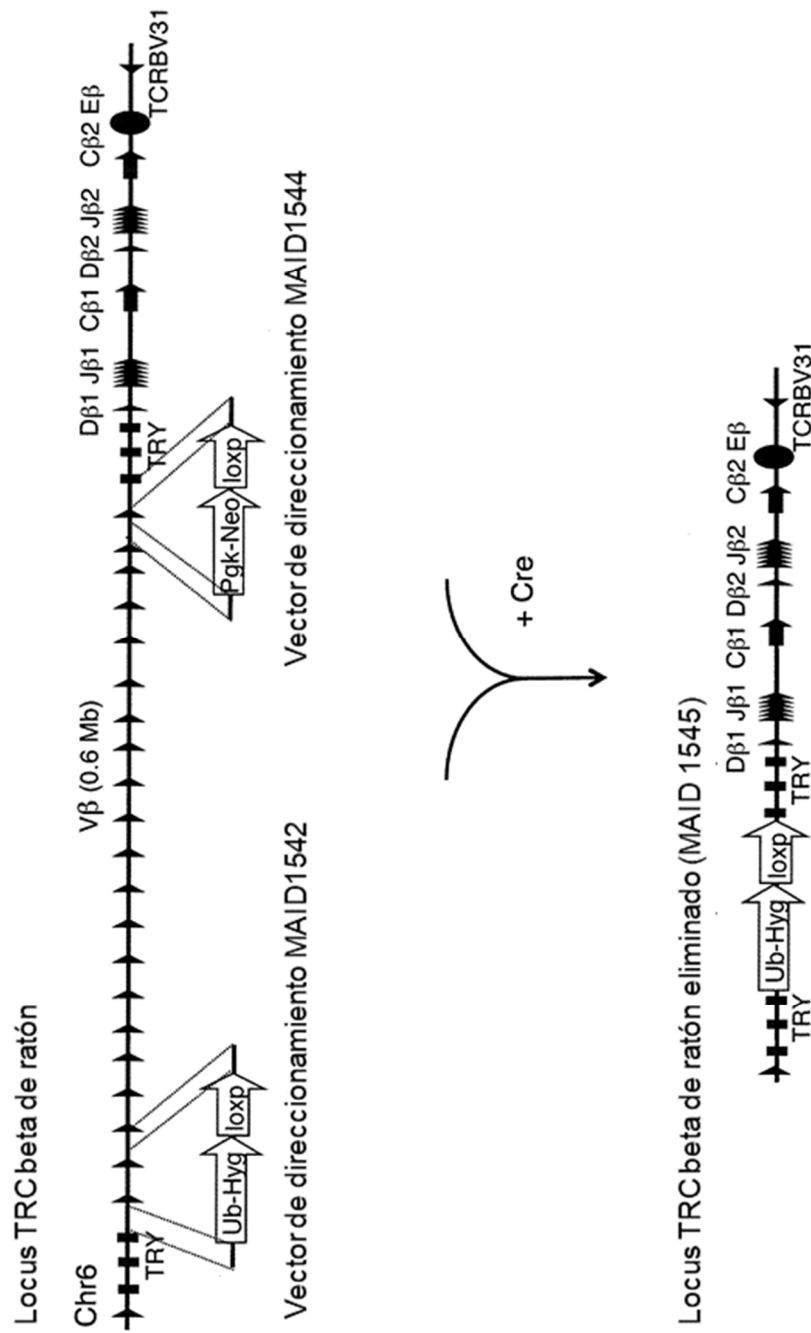


FIG. 8A

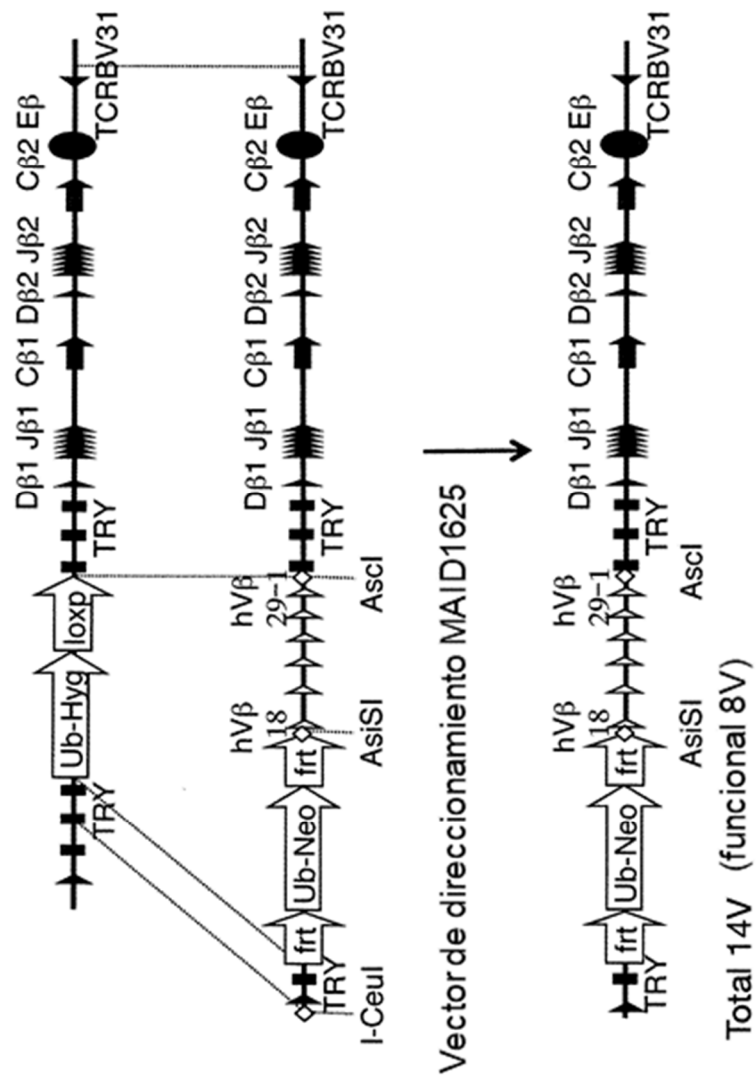


FIG. 8B

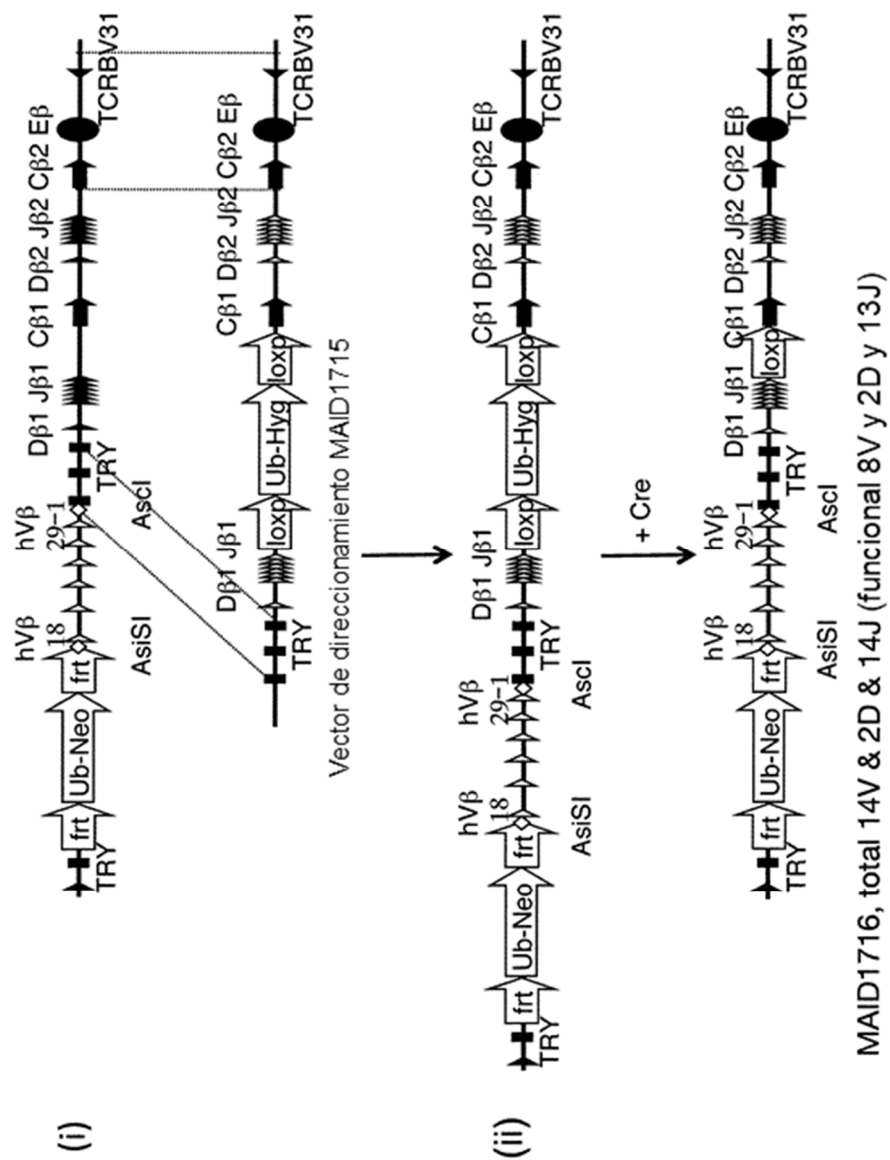


FIG. 8C

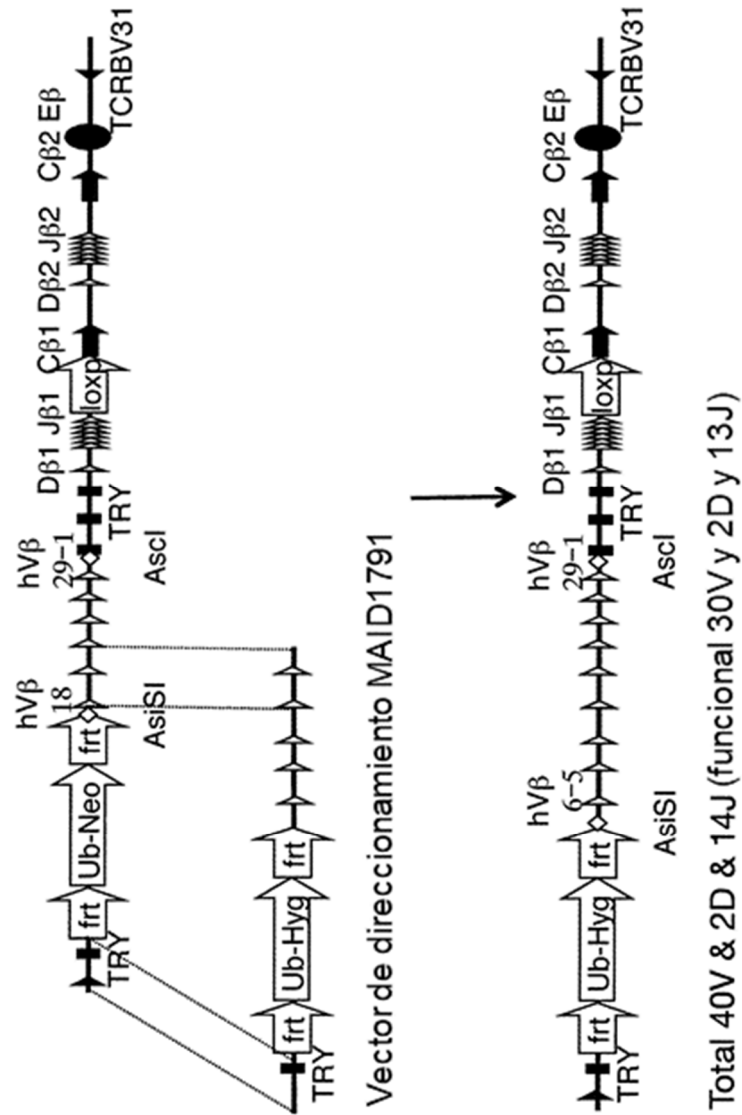


FIG. 8D

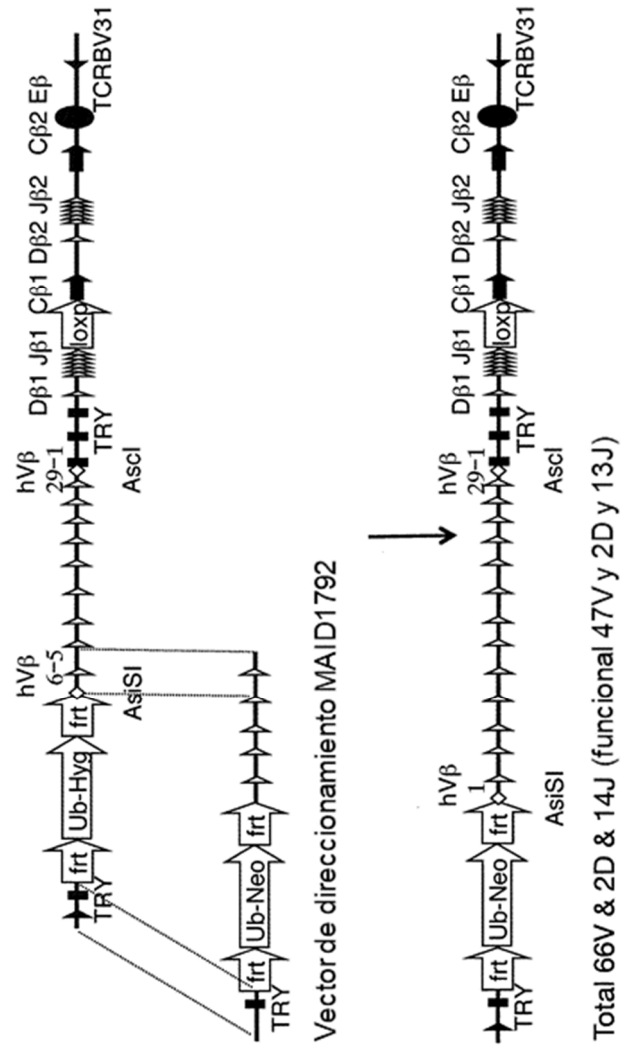
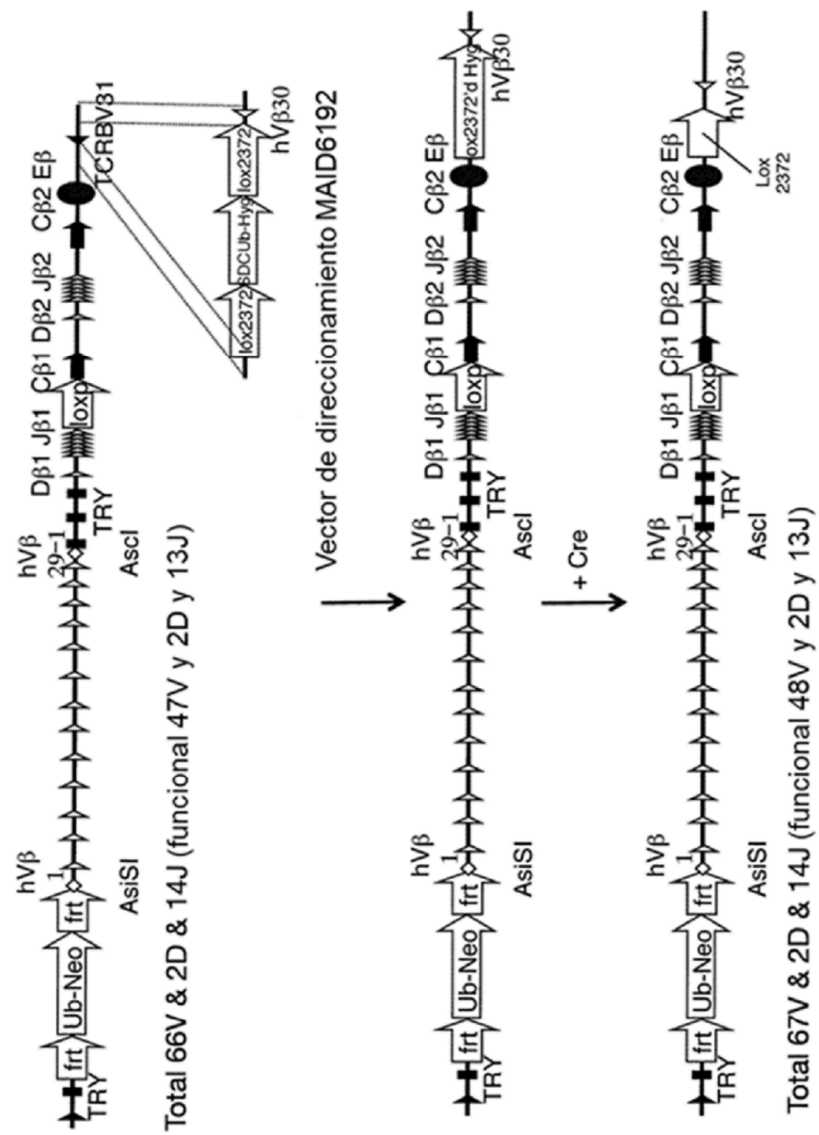


FIG. 8E



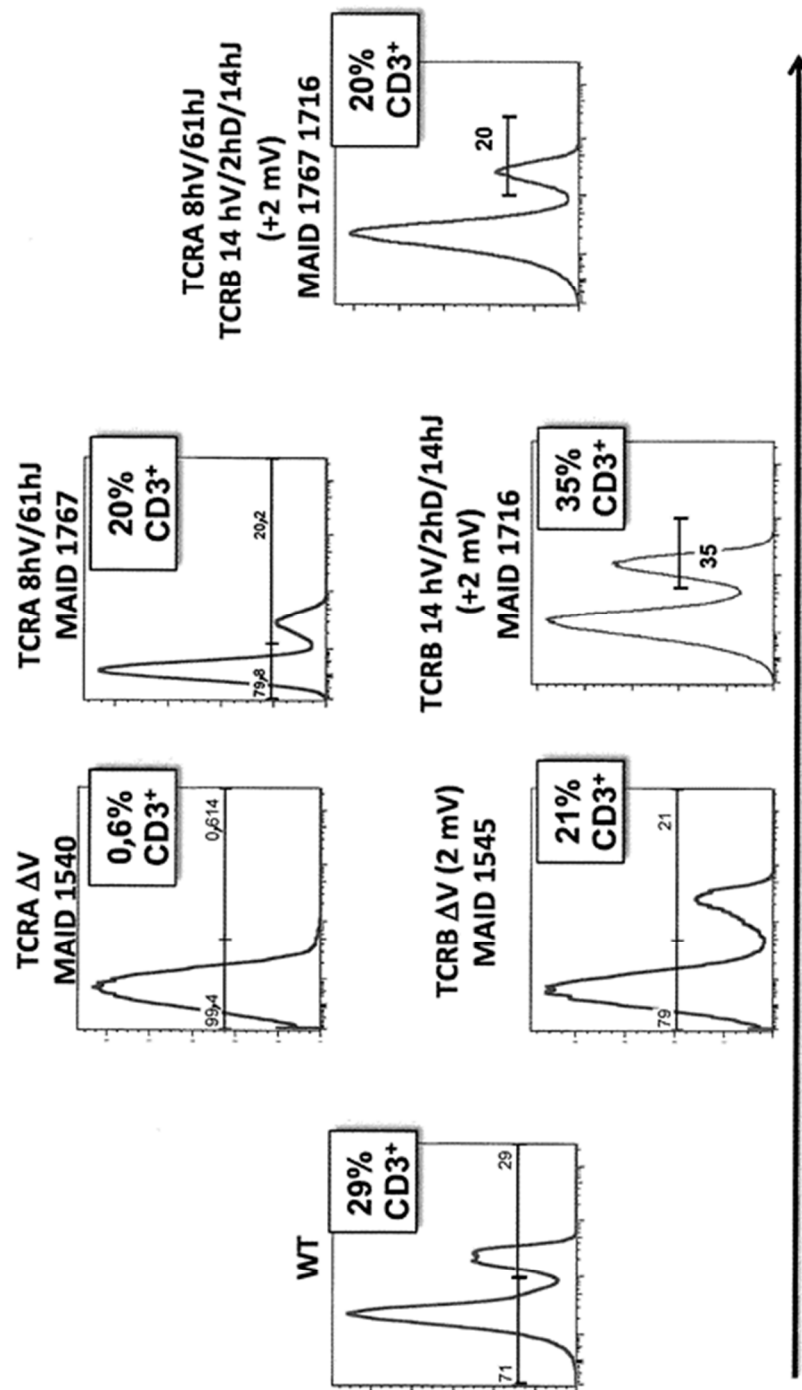


FIG. 9

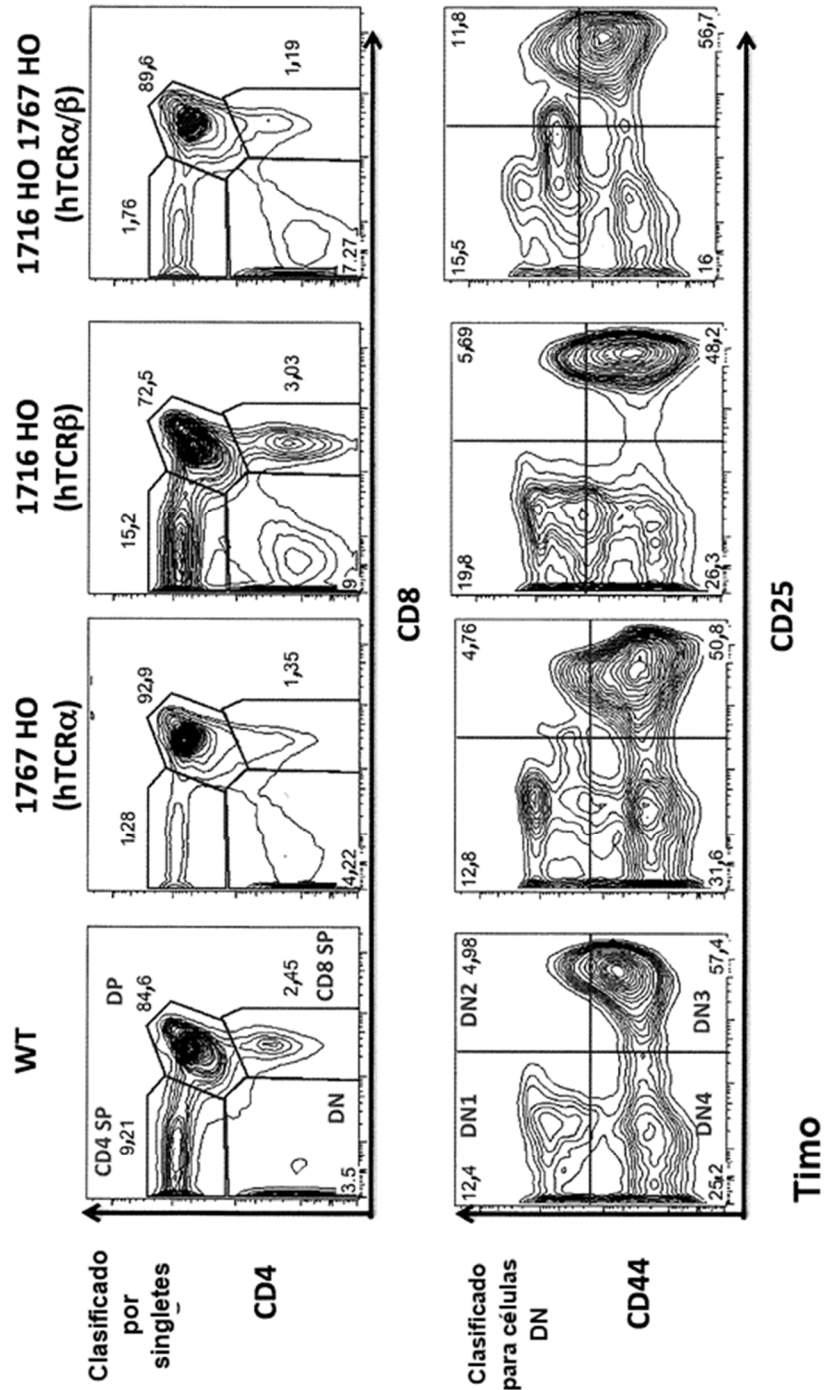
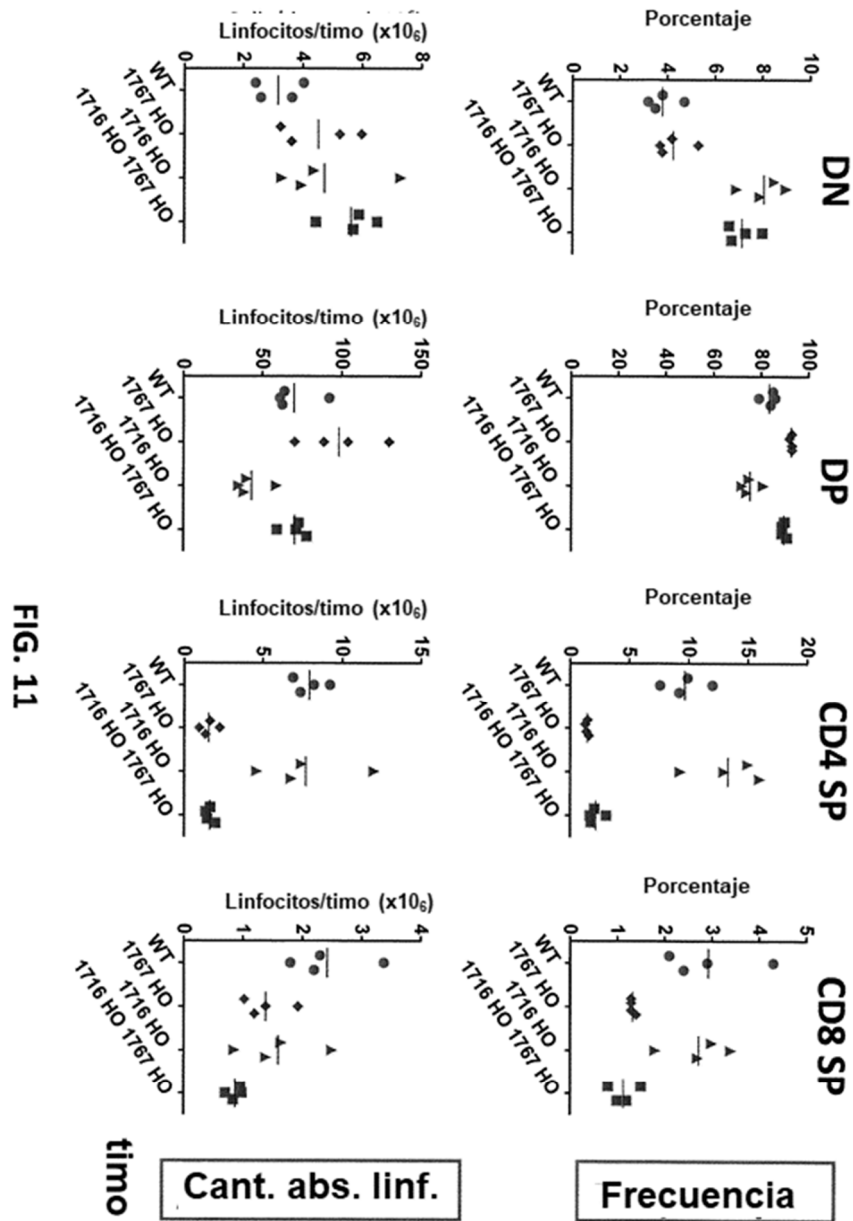


FIG. 10



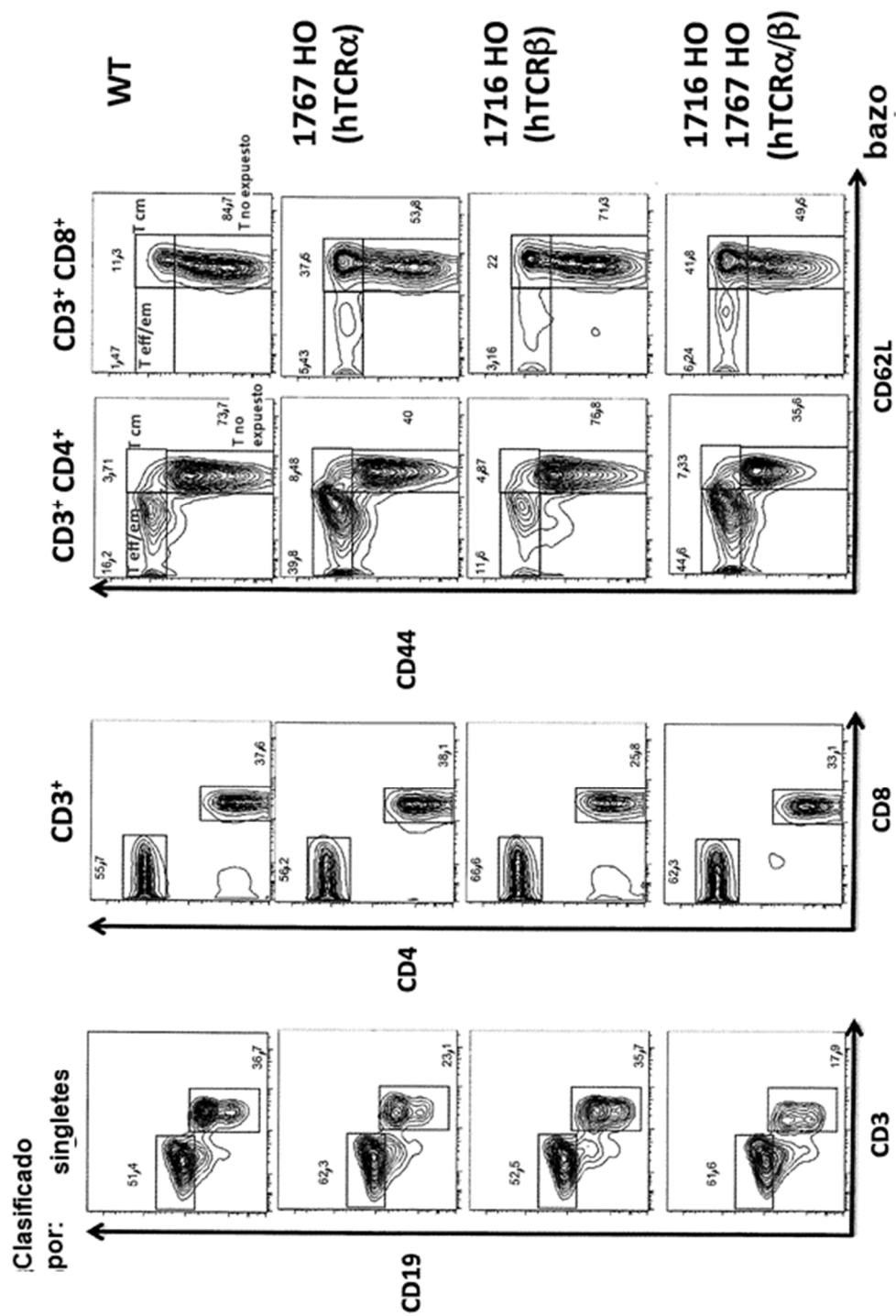


FIG. 12

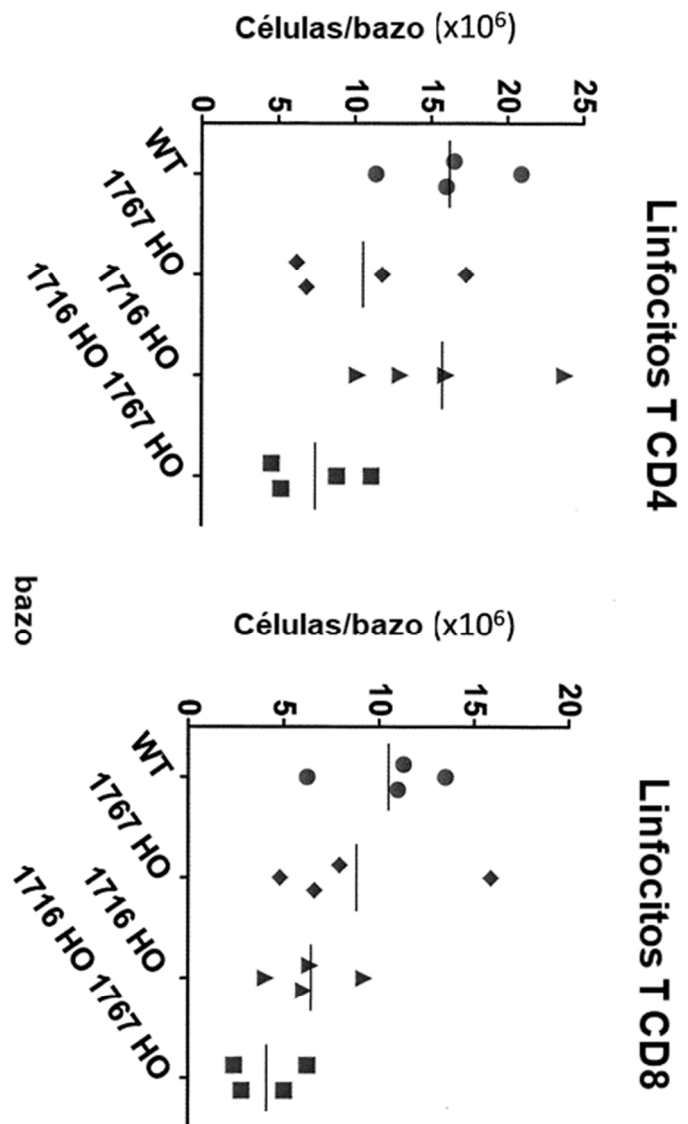


FIG. 13

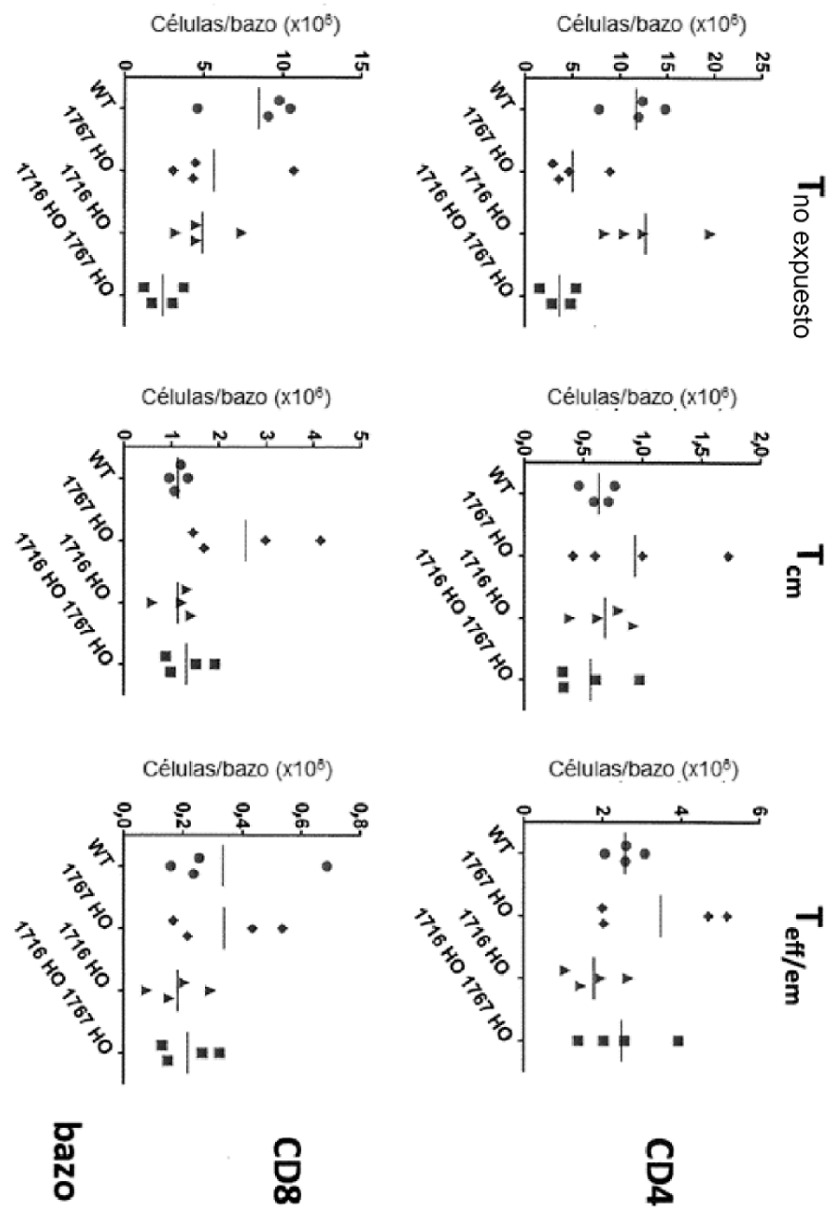


FIG. 14

FIG. 15A Porcentaje de linfocitos T CD8 que expresan hTRBV

	TRBV-18	TRBV-19	TRBV-20	TRBV-25	TRBV-27	TRBV-28	TRBV-29
WT	0,03 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,02	0,01 ± 0,01
1716 HO	0,06 ± 0,03	0,01 ± 0,01	2,68 ± 0,51	1,20 ± 0,09	13,53 ± 0,71	10,07 ± 1,63	0,00 ± 0,00
1716 HO 1767 HO	0,07 ± 0,05	0,01 ± 0,01	1,89 ± 0,35	1,12 ± 0,11	6,71 ± 0,57	7,00 ± 0,65	0,00 ± 0,00

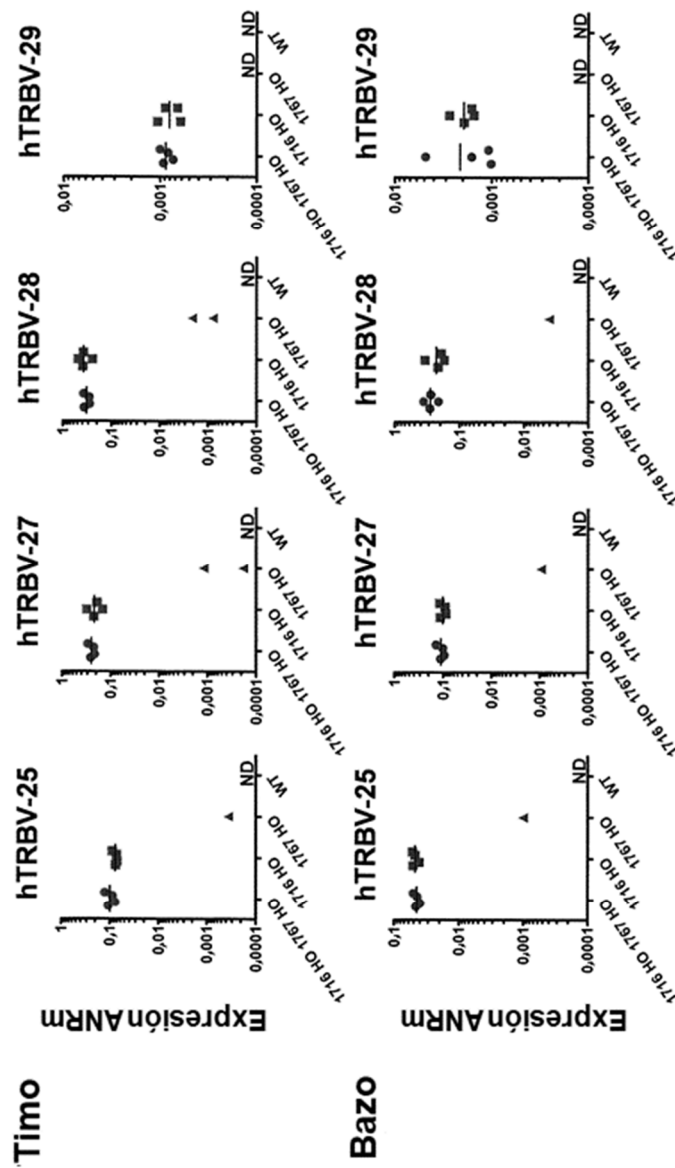
FIG. 15B Porcentaje de linfocitos T CD4 que expresan hTRBV

	TRBV-18	TRBV-19	TRBV-20	TRBV-25	TRBV-27	TRBV-28	TRBV-29
WT	0,03 ± 0,02	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,03 ± 0,02	0,01 ± 0,0	0,02 ± 0,02	0,00 ± 0,01
1716 HO	0,05 ± 0,02	0,01 ± 0,00	2,35 ± 0,46	0,52 ± 0,04	2,88 ± 0,19	3,82 ± 0,66	0,00 ± 0,00
1716 HO 1767 HO	0,05 ± 0,03	0,01 ± 0,0	2,08 ± 0,15	0,23 ± 0,06	1,57 ± 0,18	2,59 ± 0,24	0,00 ± 0,00

FIG. 15



FIG. 16A



Bazo y timo completos, ARNm normalizado a la región constante 1 de mTCRb
(n=4 ratones por grupo)
ND=no detectado (Ct ≥35)

FIG. 16B

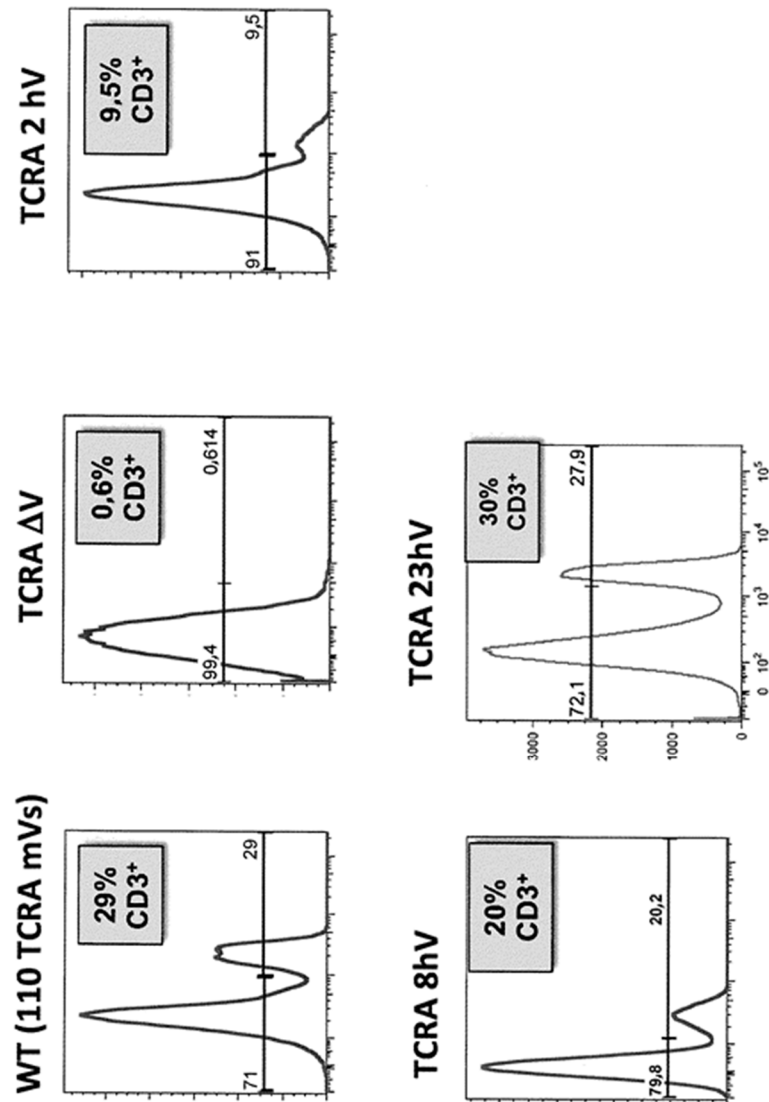


FIG. 17

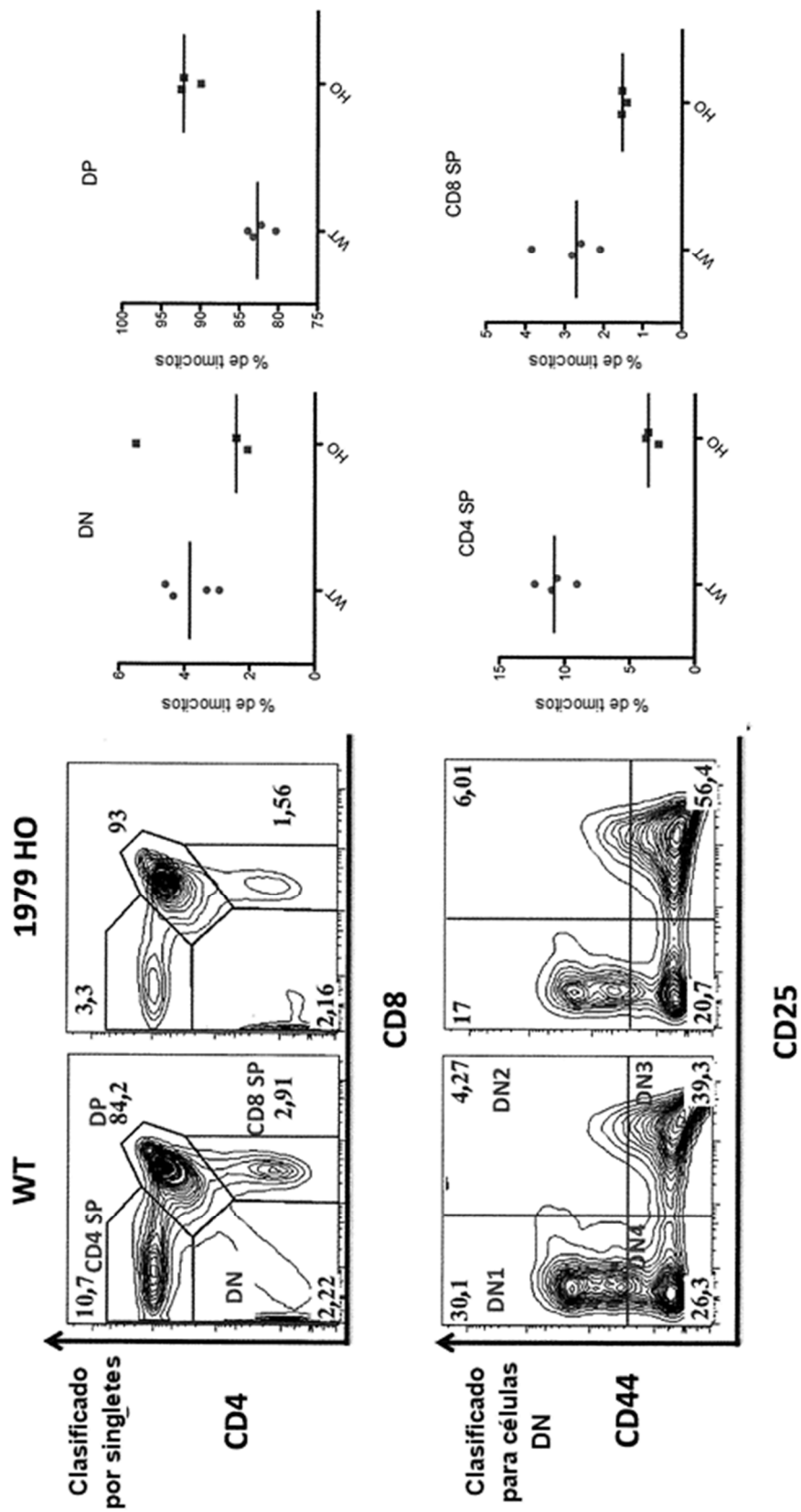


FIG. 18

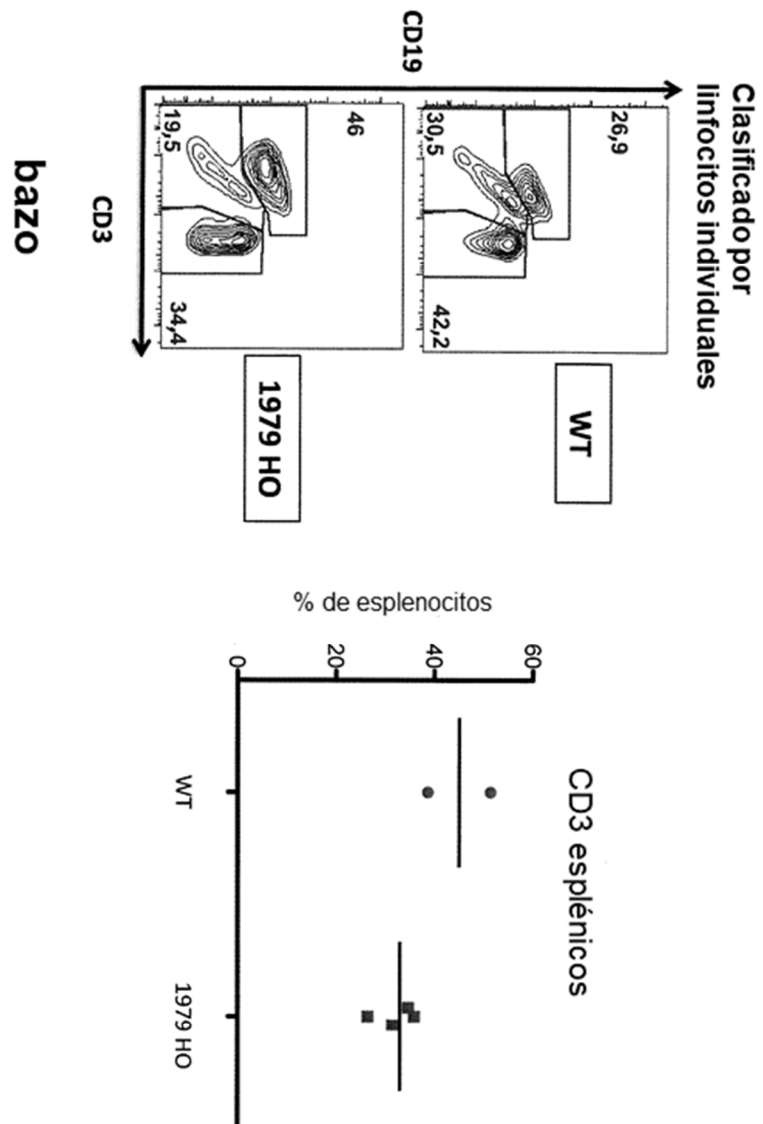


FIG. 19