(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 701 061**

(51) Int. CI.:

C07K 16/46 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA TRAS OPOSICIÓN T5

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2014 PCT/GB2014/053146**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2016 WO16062990**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2014 E 14790686 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **09.02.2022 EP 3209698**

(54) Título: **Ratones transgénicos**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
09.05.2022

(73) Titular/es:

CRESCENDO BIOLOGICS LIMITED (100.0%)
Meditrina Building Babraham Research Campus
Babraham, Cambridge CB22 3AT, GB

(72) Inventor/es:

TENG, YUMIN;
YOUNG, JOYCE;
MCGUINNESS, BRIAN;
ROMANOS, MIKE y
BRUEGGEMANN, MARIANNE

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

DESCRIPCIÓN

Ratones transgénicos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a construcciones de ácido nucleico para la expresión en ratones. La invención también se refiere al uso de estas construcciones para producir anticuerpos de solo cadena pesada, por ejemplo, producidos en ratones que están comprometidos respecto a la expresión de locus de cadena ligera (cadena L) y de cadena pesada (cadena H). La divulgación también se refiere al aislamiento y el uso de dominios V_H individuales derivados de dichos anticuerpos de solo cadena pesada.

Introducción

La mayoría de los anticuerpos naturales o inmunoglobulinas (Ig) comprenden típicamente dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L). Las cadenas H están unidas entre sí por enlaces disulfuro situados cerca de un dominio de bisagra flexible, y cada cadena H tiene una cadena L unida por disulfuro a su región N-terminal, para formar un heterotetrámero H_2L_2. Cada cadena L tiene un dominio variable (V_L) y un dominio constante (C_L), mientras que cada cadena H comprende un dominio variable (V_H), un primer dominio constante (C_H1), un dominio bisagra y dos o tres dominios constantes adicionales (C_H2, C_H3 y opcionalmente C_H4). En anticuerpos dímeros normales (H_2L_2) la interacción de cada dominio V_H y V_L forma una región de unión al antígeno (también se sabe que la interacción entre el dominio C_H1 y el dominio C_L facilita la asociación funcional entre las cadenas pesadas y ligeras).

Se conocen varias clases diferentes de Ig natural. Estas clases (o isotipos) difieren en los dominios constantes de sus cadenas H, lo que a su vez afecta a la función de la Ig. En mamíferos, los cinco isotipos de Ig son IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. La IgA comprende dominios C_H codificados por segmentos de genes C_α y tiene una función central en la inmunidad de la mucosa. La IgA secretora es dímera, contiene dos unidades H_2L_2 unidas por una cadena J y en general es abundante en secreciones como la leche y calostro. La IgA sérica está presente en los seres humanos como un monómero H_2L_2. La IgD comprende dominios C_H codificados por segmentos de gen $C_{\delta,}$ es monómera y funciona como un receptor de antígeno en células B, las células responsables de producir anticuerpos. La IgE tiene dominios C_H codificados por segmentos de gen C_ε, también es monómera, y cuando está unida a los receptores Fcε de alta afinidad en los mastocitos, se puede entrecruzar con un alérgeno lo que produce la liberación de citoquinas e histamina (respuesta alérgica). La IgG existe como cuatro subtipos diferentes en seres humanos, todos los cuales son monómeros y comprenden dominios C_H codificados por segmentos de gen C_γ. El isotipo IgG comprende la mayoría de una respuesta inmunitaria madura basada en anticuerpos (humoral). Finalmente, la IgM tiene dominios C_H codificados por segmentos de gen C_μ y (similar a la IgG, A y E) se expresa tanto en la superficie de las células B como también en forma secretada. La IgM secretada es pentámera y tiene una función clave en la eliminación de patógenos como parte de la respuesta humoral temprana.

La expresión de Ig normal en células B implica una sucesión ordenada de reordenamientos de genes. Los exones que codifican las regiones variables de las cadenas H se construyen in vivo mediante el ensamblaje de los segmentos V_H, de diversidad (D) y de unión (J_H). Las regiones variables de cadenas L se compilan en un proceso equivalente por ensamblaje de segmentos V_L y J_L. La región VDJ reordenada se transcribe inicialmente en asociación con los segmentos de gen C_μ, conduciendo a la síntesis de una cadena H de IgM. Posteriormente, en la periferia, la recombinación de cambios trae más segmentos de genes de C_H corriente abajo (δ, γ, α o ε) cerca del exón VDJ dando como resultado un cambio de clase de Ig. La maduración de células B que expresan Ig de cadena H sin cadena L se evita por la asociación de chaperonas de la cadena H en el retículo endoplásmico. Sin embargo, si está ausente C_H1 de la cadena H, este control es eliminado y la cadena H puede viajar sin obstáculos a la superficie celular y ser secretada. De hecho, los autores de la invención han demostrado previamente que, de forma bastante inesperada, los ratones $L^{-/-}$ (deficientes $\kappa^{-/-}\lambda^{-/-}$) producen diversos anticuerpos de solo cadena H en el suero sin ninguna manipulación genética adicional y lo hacen en un nivel relativamente bajo como resultado de la pérdida espontánea del exón de C_H1 de las transcripciones de la cadena H.

En tilópodos o camélidos (dromedarios, camellos y llamas), se produce un tipo principal de Ig, compuesto solamente por cadenas pesadas emparejadas (anticuerpos de cadena pesada solamente, HCAb), como parte de la respuesta inmunitaria humoral normal al antígeno además de anticuerpos H_2L_2 convencionales (Padlan, EA 1994, *Mol. Immunol.* 31:169-217). Los procesos de desarrollo que conducen a la expresión de HCAb en estos animales son desconocidos, sin embargo, se sabe que usan una clase específica de genes de V_H (V_{HH}) y Cγ que dan lugar a una cadena pesada más pequeña que la convencional, careciendo del dominio C_H1 (eliminado por corte y empalme alternativo del transcrito de ARN). Los anticuerpos de cadena pesada también están presentes en algunos peces primitivos; p. ej., el nuevo receptor de antígeno (NAR) en el tiburón nodriza y la cadena pesada especializada (COS5) en el pez rata (Greenberg et al, 1996, *Eur. J. Immunol.* 26: 1123-1129, Rast et al, 1998, *Immunogenetics*, 47:234-245). De nuevo, estas Ig de cadena pesada carecen del dominio de tipo C_H1.

Los anticuerpos convencionales se han considerado durante mucho tiempo como una herramienta poderosa basada en su exquisita selectividad, especificidad y potencia contra los antígenos objetivo. De hecho, ahora están bien consolidados como agentes terapéuticos muy eficaces, con ventas de 54 mil millones de dólares en 2012, que se espera que continúen creciendo significativamente en los próximos años. Sin embargo, existe una demanda creciente para explotar los beneficios de formatos alternativos y fragmentos más pequeños con el fin de obtener la siguiente generación de candidatos terapéuticos basados en anticuerpos.

Los fragmentos V_H o V_{HH} son la parte más pequeña de una molécula de inmunoglobulina que retienen la especificidad de la diana y la potencia y los fragmentos de anticuerpo más robustos en términos de estabilidad, solubilidad, facilidad de modificación genética y fabricación. Esto los hace agentes terapéuticos muy atractivos con ventajas significativas, en particular para el desarrollo de productos para administración local y tópica, antagonistas puros y bi o multiespecíficos. En particular, ha atraído mucha atención el potencial de dominios V_{HH} de camélidos para usar como potenciales fármacos. Sin embargo, el hecho de que no tengan una secuencia de aminoácidos humana es la característica clave que está en contra de que los dominios V_{HH} de camélido sean candidatos de fármacos óptimos, ya que tienen potencial para producir una respuesta de anticuerpos antifármaco cuando se administran a seres humanos (en particular cuando la indicación de la enfermedad requiere administración crónica).

Como consecuencia ha habido un gran interés en la producción de dominios V_H (o V_L) humanos como candidatos terapéuticos. Es bien sabido que los dominios V_H derivados de anticuerpos convencionales requieren un dominio V_L pareja, en ausencia del cual son difíciles de expresar, a menudo insolubles y sufren pérdida de afinidad y especificidad de unión al antígeno diana. Como consecuencia, los dominios V_H (o V_L) humanos aislados derivados de bibliotecas de presentación in vitro construidas usando dominios que se han desarrollado en presencia de un dominio pareja requieren modificación genética significativa para mejorar la solubilidad y la estabilidad.

La presente invención surge del sorprendente descubrimiento (ver ejemplos más adelante) de que se pueden generar diversos HCAb sin C_H1 mediante la expresión de construcciones de ácidos nucleicos quiméricos que comprenden al menos 10 genes de V funcionales humanos y no modificados genéticamente en su configuración natural en ratones con inactivación génica. La producción de HCAb en un ratón de la presente invención que tiene un locus de cadena pesada humana o quimérica integrado en su genoma ofrece numerosas ventajas en la producción de agentes terapéuticos. Dichos anticuerpos HCAb comprenden dominios V_H completamente humanos, que han madurado in vivo en ausencia de un dominio V_L pareja. Los dominios V_H derivados de dichos HCAb son muy potentes, solubles, estables y capaces de ser expresados en un alto nivel.

La técnica anterior describe la producción de anticuerpos de solo cadena pesada en ratones en los que las cadenas ligeras de inmunoglobulina se han silenciado funcionalmente y donde los transcritos de cadena H sufren de forma natural una pérdida espontánea del exón de C_H1 (documento US 12/455.913). La técnica anterior también describe la producción de HCAb usando construcciones que comprenden genes V_{HH} de camélidos (véase, por ejemplo, documento WO 2006/008548).

La presente invención se dirige a proporcionar construcciones mejoradas para la transformación de ratones y la producción de dominios V_H humanos.

Resumen de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un vector de acuerdo con la reivindicación 1.

En una realización, dicha región o gen potenciador 3' murino tiene un tamaño de al menos aproximadamente 42 kb. En una realización, dicha región potenciadora 3' murina comprende uno o más elementos potenciadores seleccionados de elementos potenciadores hs3A, hs1.2, hs3B, hs4, hs5, hs6 y hs7. En una realización, dicha región potenciadora 3' murina comprende elementos potenciadores hs3A, hs1.2, hs3B, hs4, hs5, hs6 y hs7. La invención también se refiere a una célula hospedante murina transformada con un vector de la invención. La invención se refiere además a un ratón transgénico que comprende un vector o célula hospedante de acuerdo con la invención. Preferiblemente, el ratón es un ratón con triple inactivación génica que no produce ninguna cadena ligera o pesada endógena funcional.

En un aspecto que no forma parte de la invención, la divulgación se refiere a un anticuerpo de solo cadena pesada o dominio V_H producido u obtenible a partir del ratón transgénico de la invención.

En otro aspecto más, la invención se refiere a un método para fabricar un HCAb, un fragmento del mismo o anticuerpo derivado del mismo, que comprende introducir y expresar un vector de acuerdo con la invención en un ratón. Por ejemplo, el fragmento es un dominio V_H.

En un aspecto que no forma parte de la invención, la divulgación se refiere a un anticuerpo de solo cadena pesada que comprende regiones V_H humanas y una región constante murina que carece de la región C_H1. En otro aspecto, la invención se refiere a un dominio V_H obtenido u obtenible por un método de la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un ratón transgénico de la invención para construir una biblioteca, por ejemplo, una biblioteca naïve.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para hacer una biblioteca, por ejemplo, una biblioteca naïve, usando un ratón transgénico de la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para hacer una biblioteca que comprende inmunización ex vivo de un ratón transgénico de la invención o inmunización ex vivo de tejido o células de un ratón transgénico de la invención.

En un aspecto que no forma parte de la invención, la divulgación se refiere a una composición que comprende un dominio V_H obtenido u obtenible por un método de la invención. La composición comprende el dominio V_H solo o en combinación con otro dominio V_H, proteína, u otra molécula de beneficio terapéutico.

Figuras

La invención se describe además en las siguientes figuras no limitantes.

Figura 1: BAC humanos.

Figura 2: BAC de ratón.

Figura 3: pYAC3 con a1 y a2 clonados.

Figura 4: Conversión de BAC en YAC por clonación de TAR.

Figura 5: Unión de los dos YAC por BIT. L: LYS2; A: ADE2; T: TRP1; U: URA3; K: KANr.

Figura 6: Amplificación de la región Eμ-Sμ de ratón.

Figura 7: Amplificación del fragmento Cγ1 de ratón con C_H1 eliminado.

Figura 8: Vector pYNOT.

Figura 9: Vector pHKT-Hy para generar el brazo YAC del telómero Y-*HIS3*.

Figura 10: Constructos de la invención.

YAC1: De izquierda a derecha, telómero - gen marcador *TRP1* de levadura - Centrómero- 10 genes de V humanos - genes de D humanos - genes de J humanos - potenciador μ de ratón y gen de cambio Cγ1 ($C_H1\Delta$) de ratón -potenciador 3' de ratón - gen resistente a higromicina - gen marcador de levadura *HIS3* - telómero.

YAC2: De izquierda a derecha, telómero - gen marcador *TRP1* de levadura - Centrómero - 23 genes de V humanos - genes de D humanos - genes de J humanos - potenciador μ de ratón y gen de cambio Cγ1 ($C_H1\Delta$) de ratón -potenciador 3' de ratón - gen resistente a higromicina - gen marcador de levadura *HIS3* - telómero.

YAC3: De izquierda a derecha, telómero - gen marcador *TRP1* de levadura - Centrómero - 23 genes de V humanos- genes de D humanos - genes de J humanos - potenciador μ de ratón y gen de cambio Cγ1 ($C_H1\Delta$) de ratón - gen Cγ2b ($C_H1\Delta$) de ratón - gen Cγ2a ($C_H1\Delta$) de ratón - potenciador 3' de ratón - gen resistente a higromicina - gen marcador de levadura *HIS3* - telómero.

Figura 11: Reacciones de PCR de genotipado usando ADNg de ratones con o sin locus de cadena de inmunoglobulina endógena dirigida.

Figura 12: ELISA de proteínas de inmunoglobulina de ratón en suero. El ratón TKO no tiene cadena pesada de ratón en el suero. El ratón TKO no tiene complejos de cadena pesada-cadena ligera de ratón en el suero. El ratón TKO no tiene cadenas ligeras de ratón en el suero.

Figura 13: Presentación esquemática de procedimientos de transgénesis.

Figura 14: Esquema de la construcción dirigida del transgén YAC dentro de un clon de ES.

Figura 15: Cribado por PCR del ADN genómico de crías nacidas después de microinyección pronuclear y ensayo de transmisión de la línea germinal de generación F0 a F1. a) YAC1, b) electroforesis en gel, c) resultados.

Figura 16: Número de copias del transgén YAC insertado.

Figura 17: Mapa del vector fagémido.

Figura 18: Ejemplos de transcritos generados a partir de locus transgénico reorganizado.

Figura 19: a) y b) Diversidad de secuencias de V_H clonadas. Análisis de secuencia de transcritos aislados de un solo ratón YAC1 transgénico sin tratamiento previo. Total de secuencias analizadas: 409. Número de CDR3 diferentes: 346. Longitud media de CDR3: 13,24. Se usan todos los genes de V.

Figura 20: ELISA detectando HCAb en suero.

Figura 21: Citometría de flujo usando células de médula ósea teñidas.

Figura 22: a) a c) Citometría de flujo que muestra tinción de esplenocitos.

Figura 23: Inmunohistoquímica de secciones de bazo después de la tinción con hematoxilina y eosina.

Figura 24: ELISA detectando respuestas de HCAb contra la inmunización. El suero de ratones inmunizados con varios antígenos se recogió antes de la inmunización (extracciones de sangre previas) y al final del experimento y se ensayó en ELISA para determinar su unión al antígeno diana.

Figura 25: Esquema del proceso de selección por presentación en fagos.

Figura 26: ELISA de preparaciones brutas de V_H marcadas con HIS antes y después de la selección de fagos de V_H clonado de un ratón inmunizado.

Figura 27: Secuencia de bibliotecas previas y posteriores a selección de un ratón inmunizado a). Tamaños de biblioteca y diversidad de secuencias antes de la selección. Se construyeron bibliotecas de fagos a partir de 4 ratones inmunizados y, antes de llevar a cabo la selección en antígeno, se tomaron muestras de un pequeño número (n = 69) de clones de una de las bibliotecas y se secuenciaron. Se representa la distribución de la longitud de CDR3 entre estos clones y la frecuencia de aparición de cada secuencia de CDR3. El clon 1 con 4 regiones armazón (SEQ ID NO: 143, 144, 145, 146, 147 y CDR) se muestra en b) c). Se muestran ejemplos de hipermutación somática in vivo que conduce a una unión de mayor afinidad en ELISA. Resumen de las familias de V_H de unión a antígeno aisladas usando la presentación en fagos a partir de ratones inmunizados.

Figura 28: Mediciones de BIAcore de las cinéticas de unión para V_H seleccionados.

Figura 29: Inhibición mediada por V_H de la unión del ligando al receptor.

Figura 30: a) y b) Rendimiento de V_H clonado de cultivos a escala de laboratorio.

Figura 31: Temperaturas de fusión de V_H recombinante purificado.

Figura 32: Análisis por HPLC de V_H purificado.

Figura 33: ELISA que demuestra que los ratones transgénicos que portan YAC2 en el contexto de la triple KO producen HCAb sin contaminación de cadenas ligeras endógenas. La presencia de cualquier cadena ligera endógena (HC -/-, Kappa -/-, Lambda +/- o HC -/-, Kappa +/-, Lambda -/- o HC -/-, Kappa +/-, Lambda +/-) da como resultado el emparejamiento de HCAb con la cadena ligera,

Figura 34: Gráfica de variabilidad de Kabat y Wu de 812 clones de VH de unión al antígeno aislados de ratones inmunizados con 3 antígenos diferentes. Se representa gráficamente el % de variabilidad en cada posición de aminoácido. En cada posición de aminoácido indicada, hay 5 barras que representan, en orden, secuencias de la familia VH1 (16 clones), VH2 (14 clones), VH3 (514 clones), VH4 (163 clones) y VH6 (105 clones). Las secuencias que forman los bucles CDR1, CDR2 y CDR3 están recuadradas.

Figura 35: Bibliotecas naïve. Las bibliotecas de VH1, 2, 3, 4 y 6 se generaron a partir de los bazos de 113 ratones YAC1 sin tratamiento previo.

i.) Número de clones en cada biblioteca.

ii.) Los análisis de secuencia de muestras de cada una de las bibliotecas naïve indican una buena diversidad.

iii.) Frecuencias de longitudes de aminoácidos de CDR3 en una muestra de secuencia de cada una de las bibliotecas naïve.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá ahora con más detalle. En los siguientes párrafos, se definen con más detalle diferentes aspectos de la invención. La práctica de la presente invención usará, a menos que se indique lo contrario,

técnicas convencionales de inmunología, biología molecular, química, bioquímica y tecnología de ADN recombinante, que están dentro de la experiencia en la técnica. Dichas técnicas se explican de forma completa en la bibliografía.

Los cromosomas artificiales de levadura (YAC) son vectores que se pueden usar para la clonación de insertos de ADN muy grandes en levaduras. Además de comprender los tres elementos estructurales que actúan en cis, esenciales para comportarse como los cromosomas de levaduras naturales (una secuencia de replicación autónoma (ARS), un centrómero (CEN) y dos telómeros (TEL)), su capacidad para aceptar insertos grandes de ADN les permite alcanzar el tamaño mínimo (150 kb) requerido para la estabilidad similar a un cromosoma y para la fidelidad de transmisión en células de levaduras. La construcción y el uso de YAC son bien conocidos en la técnica (p. ej., Bruschi, C.V. y Gjuracic, K. Yeast Artificial Chromosomes, ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES 2002 Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group / www.els.net).

Los autores de la invención han preparado una serie de cromosomas artificiales de levadura (YAC) para la expresión en ratones (fig. 10). Estos YAC codifican un locus de la cadena pesada humana capaz de experimentar recombinación somática en ratones transgénicos para dar lugar a un repertorio de anticuerpos de solo cadena pesada de células B. La serie de YAC tiene complejidad creciente teniendo YAC1 menos segmentos de genes de V_H que YAC2 o YAC3 y teniendo además YAC3 genes de región constante de inmunoglobulina adicionales disponibles. Como se describe en la presente memoria, esta serie de YAC puede formar la base para más construcciones de YAC con genes de V_H adicionales de modo que V(N) tiene al menos 10 V_H humanos en configuración de línea germinal en combinación con una región constante murina.

Será evidente para un experto que también se pueden incluir características adicionales, por ejemplo, para ayudar con la transfección de construcciones a citoblastos embrionarios, selección y cribado de clones de ES o para promover la integración definida durante la transgénesis, en las construcciones YAC de la invención. Será evidente para un experto en la técnica que se pueden usar vectores distintos de los YAC. Como se describe en la presente memoria, el vector, construcción de vector, construcción o transgén de la invención se puede usar en métodos para la generación de HCAb o dominios de unión de V_H completamente funcionales, específicos de antígeno, de alta afinidad, en ratones transgénicos en respuesta a la estimulación del antígeno.

El vector de expresión de la invención tiene un locus de la cadena pesada quimérica que comprende secuencias de origen humano y murino. Por lo tanto, el vector de acuerdo con la reivindicación 1 comprende un locus de la cadena pesada heterólogo. El vector comprende una región constante de la cadena pesada que no codifica un dominio C_H1. El vector se puede usar para la expresión de un locus de la cadena pesada heterólogo en ratones. Cuando se expresa en ratones, por ejemplo, ratones, el locus es capaz de formar un HCAb o dominio V_H estable y soluble.

En una realización de los diferentes aspectos de la invención descrita en la presente memoria, dicho vector es un YAC. Sin embargo, también se pueden usar otros vectores conocidos por el experto en la técnica, tales como BAC, de acuerdo con la invención.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un vector de acuerdo con la reivindicación 1.

En una realización, dicha región o gen potenciador 3' murino tiene un tamaño de al menos aproximadamente 42 kb. En una realización, dicha región potenciadora 3' murina comprende uno o más elementos potenciadores seleccionados de elementos potenciadores hs3A, hs1.2, hs3B, hs4, hs5, hs6 y hs7. En una realización, dicha región potenciadora 3' murina comprende elementos potenciadores hs3A, hs1.2, hs3B, hs4, hs5, hs6 y hs7.

En una realización, el vector comprende más de un gen de C murino seleccionado de Cγ1, Cγ2a y/o Cγ2b. En una realización, dicho gen de C murino es un gen Cγ1 murino.

De acuerdo con la reivindicación 1, el vector comprende un potenciador µ murino y un elemento de cambio µ. Por lo tanto, el elemento de cambio µ está situado en la dirección 5' del potenciador µ murino y, por lo tanto, estos elementos están en su configuración natural.

Por lo tanto, en una realización, la invención se refiere a un vector de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el gen potenciador 3' murino comprende elementos potenciadores hs3A, hs1.2, hs3B, hs4, hs5, hs6 y hs7.

Los elementos expuestos en a) a e) están en el orden 5'→ 3'. El vector de la invención es quimérico y comprende secuencias humanas y murinas. Las secuencias humanas están situadas en el extremo 5' del vector y comprenden los genes de V, D y J de la cadena pesada. La región 3' del vector situada en la dirección 3' del gen de J humano comprende secuencias de origen murino y no comprende secuencias de origen humano.

Como se ha mencionado en otra parte, en una realización, el vector es un YAC.

En una realización, el vector comprende secuencia humana de al menos aproximadamente 0,5 MB.

De acuerdo con la invención, el vector comprende al menos 10 genes de V de la cadena pesada humana funcionales en el mismo orden secuencial en el que se pueden encontrar en la línea germinal humana y comprenden secuencias intermedias. En una realización, el vector puede comprender de al menos 10 a todos los genes de V humanos funcionales. En una realización, el número de genes de V es de 10 a aproximadamente 44. En una realización, el número de genes de V funcionales es de 10 a 20, de 10 a 30 o de 10 a 44. En una realización, el número de genes de V funcionales es de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 28, 29, 40, 41, 42, 43 o 44. En una realización, el número de genes de V funcionales es de 10 a 23.

En una realización, el vector de acuerdo con la reivindicación 1 puede comprender repeticiones en tándem de genes de V funcionales. Cada repetición en tándem comprende al menos 10 genes de V de la cadena pesada humana que se encuentran en su configuración natural. Por consiguiente, el vector puede comprender de al menos 10 a cientos de genes de V funcionales, por ejemplo, de 10 a aproximadamente 50, de 10 a aproximadamente 100, de 10 a aproximadamente 200 o más. En una realización, el vector puede comprender más de 10 genes de V funcionales. Dentro de cada repetición en tándem, al menos 10 genes de V funcionales están en su configuración natural.

Por ejemplo, los vectores de acuerdo con la invención que tienen 10 o 23 genes de V de la cadena pesada humana funcionales respectivamente se muestran como YAC 1, 2 y 3 en la figura 10. Sin embargo, un experto en la técnica apreciaría que la invención no se limita a los YAC mostrados en la figura 10 y se pueden incluir genes de V funcionales adicionales, con la condición de que las otras características de diseño del vector de acuerdo con la invención no estén comprometidas.

Los genes de V son de origen humano y funcional. Por consiguiente, los genes de V codifican un producto génico y no son pseudogenes (aunque pueden estar presentes pseudogenes dentro de la construcción, pero no se cuentan en la determinación del número de genes de V funcionales).

Además, de acuerdo con las construcciones de vectores de la reivindicación 1, al menos 10 de los genes de V funcionales presentes en el vector están en su configuración natural. En otras palabras, la construcción de la invención comprende al menos 10 genes de V humanos funcionales en configuración natural no reorganizada. La construcción de la invención comprende al menos 10 genes de V humanos funcionales en configuración natural no reorganizada. En un aspecto de la divulgación, la expresión configuración natural se refiere al orden de los genes y/o la secuencia de ADN. Por lo tanto, en los al menos 10 genes de V humanos funcionales de los genes de V humanos que están comprendidos en el vector de la invención están en el mismo orden secuencial en el que se pueden encontrar en la línea germinal humana. En otras palabras, la construcción de la invención comprende al menos 10 genes de V humanos funcionales en orden no reorganizado. El vector comprende 10 genes de V humanos funcionales en orden no reorganizado. En una realización, el vector comprende más de 10 genes de V humanos funcionales y 10 de estos están en orden no reorganizado. En una realización, el vector comprende más de 10 genes de V humanos funcionales en donde todos están en orden no reorganizado. Por lo tanto, la invención excluye la combinación de al menos 10 genes de V humanos funcionales diferentes donde los genes de V se seleccionan y combinan para que ya no estén en su orden natural.

Los al menos 10 genes de V en su orden natural también comprenden secuencias intermedias.

Además, las secuencias de al menos 10 genes de V humanos funcionales y sus regiones intermedias son sustancialmente como se pueden encontrar en la línea germinal humana. Por ejemplo, la secuencia muestra al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia como se puede encontrar en la línea germinal humana. Las regiones intermedias son importantes ya que influyen en el acceso a los genes de V y determinan cómo se usan para generar el repertorio de anticuerpos. Como apreciará un experto en la técnica, pueden ocurrir pequeñas diferencias en la secuencia debido a sucesos de recombinación en levaduras durante el procedimiento para construir construcciones de vectores de la invención.

De acuerdo con la invención, al menos 10 genes de V humanos funcionales usados en las construcciones de la invención no están modificados por manipulaciones dirigidas para eliminar o alterar una o más secuencias intermedias que están situadas entre genes de V funcionales. Dichas manipulaciones dirigidas excluyen pequeñas diferencias en la secuencia debido a sucesos de recombinación en levaduras durante el procedimiento para construir construcciones de vectores de la invención. Por lo tanto, la construcción de la invención comprende al menos 10 genes de V humanos funcionales en una secuencia sustancialmente natural.

Además, preferiblemente, los genes de V no están modificados genéticamente para alterar los restos para aumentar la solubilidad. En otras palabras, los genes de V son naturales.

Las combinaciones específicas de genes de V humanos funcionales usadas en un vector, por ejemplo, un YAC, de la invención se muestran en los ejemplos. Sin embargo, no hay ningún requisito para ninguna combinación específica de genes de V y se puede usar cualquier gen de V humano funcional para la expresión productiva de un HCAb siempre que al menos 10 genes de V humanos funcionales comprendidos en el vector estén en el mismo orden en el que se pueden encontrar en la línea germinal humana.

Como se ha descrito antes, el vector incluye los genes de D y J de la cadena pesada humana. Por lo tanto, al menos un gen, preferiblemente más, de D de la cadena pesada humana, y al menos un gen, preferiblemente más, de J humano, están presentes en las construcciones de la invención. En una realización, la construcción incluye 1-19, por ejemplo, al menos 5, al menos 10, al menos 15 o más genes de D de la cadena pesada humana. En una realización, la construcción incluye al menos 5, al menos 10, al menos 15 o más genes de J de la cadena pesada humana. En una realización, la construcción incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 genes de J y D de la cadena pesada humana. En una realización, la construcción de la invención incluye todos los genes de D de la cadena pesada humana. En una realización, la construcción de la invención incluye todos los genes de J de la cadena pesada humanos. En otra realización, los genes de D y J de la cadena pesada humana están sustancialmente en su configuración natural. En una realización, los genes D y J de la cadena pesada humana están en el mismo orden en el que se pueden encontrar en la línea germinal humana. Por lo tanto, preferiblemente, de acuerdo con la invención, los genes de D y J usados en las construcciones de la invención no se modifican mediante manipulación dirigida para eliminar o alterar una o más secuencias intermedias.

Las construcciones de vectores de la invención también incluyen un potenciador μ murino, un regulador principal de la transcripción del gen de IgH y la recombinación VDJ, y un elemento de cambio μ murino. Un elemento de cambio es esencial para el cambio de clase.

De acuerdo con la reivindicación 1, el gen de la región C se selecciona de Cγ1, Cγ2b y/o Cγ2a. En una realización, el vector comprende Cγ1, Cγ2b y Cγ2a.

Por lo tanto, las construcciones de vectores de la invención incluyen un gen Cγ1 de ratón que carece de exón de C_H1. Sin embargo, las construcciones de vectores también pueden comprender genes o regiones C adicionales seleccionadas de Cγ2b y/o Cγ2a.

De acuerdo con la reivindicación 1, el vector incluye una región potenciadora 3' murina. Preferiblemente, esta es una región que tiene un tamaño de aproximadamente 42 kb. En una realización, esta región comprende elementos potenciadores hs3A, hs1.2, hs3B, hs4 y una región aislante prevista que contiene elementos hs5, hs6 y hs7 (Garrett et al., 2005; Chatterjee et al., 2011). Como se muestra en los ejemplos, esta es una región que tiene un tamaño de aproximadamente 42 kb que contiene múltiples sitios hipersensibles (hs) de ADNasa I, indicativos de la existencia de elementos reguladores. Se mostró que era esencial un potenciador 3' en el proceso de recombinación de cambio de clase durante el desarrollo de las células B y en la expresión de IgH (Lieberson et al, 1995; Vincent-Fabert et al., 2010). Se identificó que una región de 747 pb en el potenciador 3' de rata tenía actividad potenciadora a través de un ensayo in vitro midiendo la transcripción del gen de globina β humana (Pettersson et al., 1990). Los ratones con eliminaciones dirigidas de cada uno de los elementos potenciadores individuales hs3A, hs1.2, hs3B y hs4 eran indistinguibles en el cambio de clase de los controles de tipo natural (Cogne et al., 1994; Manis et al., 1998; Zhang et al., 2007; Vincent-Fabert et al., 2009; Bebin et al., 2010). Sin embargo, una eliminación combinada de los cuatro elementos de hs eliminaba el cambio de clase a todos los isotipos (Vincent-Fabert et al., 2010). Se prevé que las regiones aislantes aíslen el locus de IgH de genes que no son de IgH situados en la dirección 3' o en otro sitio (Chatterjee et al., 2011). Por lo tanto, la inclusión de un potenciador 3' de tamaño completo en las construcciones de YAC de la invención proporciona una fuente de todos los elementos potenciadores sin papeles redundantes y sinérgicos, así como el aislante para proteger el resto del locus genómico.

El vector puede comprender además genes marcadores, por ejemplo, los genes marcadores de levadura *TRP1, HIS3* y/o *ADE2,* y/o un gen resistente a la higromicina. Se pueden incluir marcadores de selección adicionales.

Las construcciones de vectores de acuerdo con la invención con 10 o más genes de V humanos funcionales se pueden generar in vitro o in vivo como se muestra en los ejemplos. Para la generación in vivo, por ejemplo, se introduce YAC1 como se muestra en la figura 10 en células ES de ratón y el número de genes de V se extiende por la inserción del gen dirigido en las células ES. Brevemente, los vectores dirigidos con los genes de V añadidos, junto con una región de homología con el transgén existente, se usan para extender el transgén mediante un suceso de recombinación homóloga.

Las células ES que contienen un vector de la invención como un vector de transgén se pueden obtener sea por introducción directa del ADN vector en células ES mediante transfección, o por derivación de células ES de un ratón a partir de un ratón que lleva un transgén. Las células ES re-derivadas llevarán el transgén en el mismo número de copias y la misma ubicación genómica que el ratón, mientras que las células transfectadas pueden tener un número de copias variante y pueden integrarse en cualquier parte del genoma del ratón, a menos que se dirijan específicamente.

El YAC u otro vector de acuerdo con la invención se puede introducir en una célula de ratón o ratón para la producción de HCAb o fragmentos de los mismos como un transgén. Como se explica más adelante, los dominios V_H que son solubles, no se agregan y son sustancialmente monómeros se pueden producir en el ratón como se detalla más adelante.

En otro aspecto, la invención proporciona un ratón transgénico o una célula hospedante murina transgénica transformada con un vector de la invención y como se describe en la presente memoria y, por lo tanto, que expresa un locus de la cadena pesada heterólogo. Por lo tanto, en un aspecto, la invención se refiere a un ratón transgénico transformado con un YAC u otro vector de acuerdo con la reivindicación 1

El elemento potenciador 3' murino es como se describe en otra parte. Otras características del vector también se describen en otra parte. En una realización, dicho vector es un YAC.

En una realización, dicho gen de C murino es un gen Cγ1 murino. En una realización, dicho elemento potenciador 3' murino comprende elementos potenciadores hs3A, hs1.2, hs3B, hs4, hs5, hs6 y hs7. Por lo tanto, en una realización, la invención se refiere a un ratón transgénico o célula hospedante murina transformada con un YAC que comprende

a) al menos 10 genes de V de la cadena pesada humana funcionales en donde al menos 10 genes de V de la cadena pesada humana funcionales en el mismo orden secuencial en el que se pueden encontrar en la línea germinal humana y comprenden secuencias intermedias;

b) al menos un gen de D de la cadena pesada humana y al menos un gen de J de la cadena pesada humana;

c) un potenciador μ murino y un elemento de cambio μ

d) un gen Cγ1 murino que carece del exón de C_H1 y

e) un elemento potenciador 3' murino que comprende elementos potenciadores hs3A, hs1.2, hs3B, hs4, hs5, hs6 y hs7

en donde el YAC no comprende un gen de C murino adicional.

En una realización, la célula hospedante es una célula hospedante murina. En una realización, el ratón transgénico tiene una capacidad reducida para expresar genes de anticuerpos endógenos. Por lo tanto, en una realización, el ratón tiene una capacidad reducida para expresar genes de anticuerpos de cadena ligera y/o pesada endógenos. Por lo tanto, el ratón puede comprender modificaciones adicionales para alterar la expresión de genes de anticuerpos de la cadena ligera y/o pesada endógenos, de modo que no se produzcan cadenas ligeras y/o pesadas funcionales.

En una realización, el ratón puede comprender un locus de cadena ligera lambda no funcional. Por lo tanto, el ratón no produce una cadena ligera lambda endógena funcional. En una realización, el locus de la cadena ligera lambda se elimina en parte o completamente o se vuelve no funcional por inserción. Por ejemplo, al menos los genes de la región constante C1, C2 y C3 se pueden eliminar o volverlos no funcionales por inserción. En una realización, el locus está silenciado funcionalmente de modo que el ratón no produce una cadena ligera lambda funcional.

Además, el ratón puede comprender un locus de cadena ligera kappa no funcional. Por lo tanto, el ratón no produce una cadena ligera kappa endógena funcional. En una realización, el locus de la cadena ligera kappa se elimina en parte o completamente o se vuelve no funcional por inserción. En una realización, el locus está silenciado funcionalmente de modo que el ratón no produce una cadena ligera kappa funcional.

El ratón que tiene locus de cadena L lambda y kappa endógenos funcionalmente silenciados, se puede hacer como se describe, por ejemplo, en el documento WO2003/000737.

Además, el ratón puede comprender un locus de la cadena pesada no funcional. Por lo tanto, el ratón no produce una cadena pesada endógena funcional. En una realización, el locus de la cadena pesada se elimina en parte o completamente o se vuelve no funcional por inserción. En una realización, el locus está silenciado funcionalmente de modo que el ratón no produce una cadena pesada funcional.

Por ejemplo, como se describe en el documento WO2004/076618, los 8 genes de inmunoglobulina de la región constante de la cadena pesada endógena (μ, δ, γ3, γ1, γ2a, γ2b, ε y α) están ausentes en el ratón, o parcialmente ausentes en la medida en que no son funcionales, o los genes δ, γ3, γ1, γ2a, γ2b y ε están ausentes y los genes flanqueadores μ y α están parcialmente ausentes en la medida en que se vuelven no funcionales, o los genes μ, δ, γ3, γ1, γ2a, γ2b y ε están ausentes y α está parcialmente ausente en la medida en que se vuelve no funcional, o δ, γ3, γ1, γ2a, γ2b, ε y α están ausentes y μ está parcialmente ausente en la medida en que se vuelve no funcional.

Por eliminación en parte se entiende que la secuencia del gen del locus endógeno se ha eliminado o alterado, por ejemplo, por una inserción, en la medida en que el locus no codifica producto génico endógeno funcional, es decir, que no se expresa ningún producto funcional desde el locus. En otra realización, el locus está funcionalmente silenciado.

En una realización, el ratón que expresa un vector de la invención comprende un locus de la cadena pesada no funcional, un locus de cadena ligera lambda no funcional y un locus de cadena ligera kappa no funcional. Por lo tanto,

el ratón no produce ninguna cadena ligera o pesada endógena funcional. Por lo tanto, el ratón es un ratón con triple inactivación génica (TKO, por sus siglas en inglés *triple knockout*).

Los ratones transgénicos se pueden crear de acuerdo con técnicas estándar que se ilustran en los ejemplos (véase la fig. 13). Las dos rutas más caracterizadas para crear ratones transgénicos son por microinyección pronuclear de material genético en ovocitos recién fertilizados o por la introducción de citoblastos embrionarios transfectados de manera estable en embriones en fase mórula o blastocisto.

Las líneas celulares ES que llevan el transgén se generan in vitro o derivan de embriones de ratones transgénicos. Se pueden introducir nuevas características en el transgén por recombinación homóloga o mediante el uso de vectores de inserción. Se introducen construcciones en las células ES usando (por ejemplo) lipofección, electroporación u otros métodos conocidos en la técnica. Los clones que llevan el marcador de resistencia seleccionable se seleccionan y se criban de acuerdo con la integración satisfactoria. Tanto las construcciones como las células ES se pueden modificar con características moleculares para ayudar tanto en la integración de construcciones deseadas como el cribado y selección de clones ES dirigidos correctamente.

La modificación genética de transgenes puede incluir una o más de las siguientes características, todas las cuales son conocidas en la técnica:

- Marcadores de selección: Bsd, Zeo, Puro, Hyg que se pueden usar en cualquier combinación
- Marcador seleccionable negativo: timidina quinasa (TK). La selección negativa se puede usar en combinación con uno o más marcadores de selección
- Los marcadores y/o la secuencia del vector pueden estar flanqueados por sitios loxP, variante de loxP, Frt o variante de Frt. Los pares de sitios pueden ser idénticos o no idénticos. Se pueden usar más de dos sitios.
- Uso de recombinasas (Cre, Flp) para eliminar, invertir o reemplazar secuencias
- Generación de rotura de doble cadena genómica en secuencias definidas, por ejemplo, por:
  - Dedos de zinc
  - TALEN
  - CRISPR
  - Mega nucleasas (endonucleasas de asentamiento)

Se puede lograr una construcción dirigida en una o múltiples etapas. Se puede insertar la secuencia por recombinación homóloga y eliminar un marcador seleccionable por posterior eliminación mediada por recombinasa. Alternativamente, una primera etapa de modificación podría introducir características tales como sitios de reconocimiento de recombinasa y, opcionalmente, un marcador seleccionable negativo, que se podría usar para introducir la secuencia por intercambio de casete mediado por recombinación.

Las estrategias usadas para una construcción dirigida pueden incluir vectores de sustitución, vectores de inserción o intercambio de casete mediado por recombinación (RMCE). El ADN se puede introducir y/o eliminar en cada etapa. El ADN introducido puede ser de origen humano, bacteriano, de levadura o vírico. El ADN se puede introducir en cualquier ubicación dentro del transgén. La ingeniería transgénica puede usar secuencias genómicas circundantes.

La construcción dirigida dará como resultado un locus transgénico en el que los genes de V, D y J están en el mismo orden y separación que en el locus de IgH humana natural, y en el que las regiones C están como en el locus de ratón natural. Se pueden producir polimorfismos, incluyendo cambios mínimos causados por recombinación (como cicatrices o pequeñas eliminaciones).

Independientemente de cómo se introduce el material genético, los embriones manipulados se transfieren a receptores hembra pseudo-preñadas donde continúa el embarazo y nacen crías transgénicas candidatas.

Las principales diferencias entre estos amplios métodos son que los clones de ES se pueden cribar extensamente antes de usar para crear un animal transgénico. Además, el transgén se puede integrar en las células ES en una ubicación definida o integrarse aleatoriamente. En cambio, la microinyección pronuclear se basa en el material genético que se integra al genoma del hospedante después de su introducción y, hablando en general, la incorporación y función satisfactorias del transgén no se pueden confirmar hasta después de que nazcan las crías.

Hay muchos métodos conocidos en la técnica tanto para ayudar como para determinar si se produce una integración satisfactoria de transgenes. Los animales transgénicos se pueden generar por múltiples medios, incluyendo la integración aleatoria de la construcción en el genoma, integración específica del sitio o la recombinación homóloga.

Existen varias herramientas y técnicas que se pueden usar tanto para guiar y seleccionar la integración transgénica como para la modificación posterior, incluyendo el uso de marcadores de resistencia a fármacos (selección positiva), recombinasas, intercambio de casete mediado por recombinación, técnicas de selección negativa y nucleasas para mejorar la eficacia de la recombinación. La mayoría de estos métodos se usan habitualmente en la modificación de células ES. Sin embargo, algunas de las técnicas pueden ser útiles para mejorar la transgénesis mediada por inyección pronuclear.

Se pueden usar refinamientos adicionales para dar una generación más eficaz de la línea transgénica dentro del contexto deseado. Como se ha descrito antes, en realizaciones preferidas, la expresión de inmunoglobulina de ratón endógena se silencia para permitir solo la expresión de HCAb para el descubrimiento de fármacos. Se pueden usar ratones manipulados genéticamente, por ejemplo, ratones TKO que están silenciados para todos los locus de inmunoglobulina endógenos (cadena pesada de ratón, cadena kappa de ratón y cadena lambda de ratón) como se ha descrito antes. La transferencia de cualquier transgén introducido a este contexto de TKO se puede lograr por reproducción (ya sea convencional o con la inclusión de una etapa de FIV para dar una escala eficiente del procedimiento). Sin embargo, también se puede incluir el contexto de TKO durante el procedimiento de transgénesis. Por ejemplo, para la microinyección, los ovocitos se pueden obtener de donantes con TKO. De forma similar, también se han obtenido células ES de embriones con TKO (véase más adelante) para usar en la transgénesis. Además, como se ha mencionado antes, puesto que el YAC1 es una estructura central común presente en construcciones alternativas (descritas en la figura 10), las células ES derivadas de ratones transgénicos YAC1 se pueden usar para adiciones dirigidas para dar lugar a un transgén con las mismas características que las del YAC2, 3 u otros YAC con un diseño central de YAC1. Las diversas opciones de transgénesis se resumen en la fig. 13.

Un aspecto adicional de la invención es el uso de un ratón como se describe en la presente memoria que expresa un vector de la invención, en la producción de un HCAb que carece de un dominio C_H1 funcional. Este es preferiblemente un ratón con triple inactivación génica como se describe en la presente memoria. En una realización, el HCAb puede ser un anticuerpo quimérico, por ejemplo, que incluye secuencias derivadas de un roedor y un ser humano. En otra realización, el ratón de la invención se usa en un método para producir dominios V_H solubles. Por lo tanto, los dominios de unión a V_H solubles se pueden producir usando el ratón de la invención.

El ratón de la invención también se puede usar para construir bibliotecas, tales como bibliotecas de presentación in vitro. Esto se ilustra en los ejemplos no limitativos. En una realización, el ratón de la invención se usa para construir bibliotecas naïve. Por lo tanto, la invención se refiere al uso de un ratón de la invención para construir bibliotecas. En una realización, la biblioteca es una biblioteca naïve. En una realización, la inmunización es ex vivo.

Un aspecto que no forma parte de la invención es un método para generar una célula murina o ratón que produce un HCAb, que comprende introducir un vector como se describe en la presente memoria en un ratón. Preferiblemente, dicho ratón comprende un locus de la cadena pesada no funcional, un locus de cadena ligera lambda no funcional y un locus de cadena ligera kappa no funcional. En una realización, dicho método comprende generar una biblioteca naïve a partir de dicho ratón. En otra realización, dicho ratón se inmuniza, por ejemplo, por inmunización ex vivo.

La invención también proporciona un método para fabricar un HCAb o dominio V_H de acuerdo con la reivindicación 14, de un ratón, que comprende las etapas de:

(i) introducción de un vector de la reivindicación 1, por ejemplo, un YAC;

(ii) permitir la formación en el ratón de un HCAb o molécula de unión al antígeno que carece de un dominio C_H1 funcional; y

(iii) obtener el HCAb o la molécula de unión al antígeno del suero de ratón.

Preferiblemente, dicho ratón comprende un locus de cadena pesada no funcional, un locus de cadena ligera lambda no funcional y un locus de cadena ligera kappa no funcional.

Los segmentos de genes de V, D y J, cuando se expresan en el ratón de la reivindicación 8, son capaces de recombinarse para formar una secuencia que codifica VDJ. Además, el locus heterólogo, cuando se expresa en el ratón, es capaz de formar moléculas de inmunoglobulina funcionales de cualquier clase cuyo gen constante está incluido en el vector introducido en un ratón. La clase de anticuerpo vendrá dada por los genes de C presentes en la construcción. Por lo tanto, el isotipo del anticuerpo es IgG. La IgG se puede seleccionar de cualquier subclase. Por lo tanto, la invención proporciona una forma de modificación genética eficiente de HCAb específico de clase y anticuerpos de un solo dominio, en particular dominios V_H solubles.

La divulgación también proporciona una célula productora de HCAb o productora de dominio V_H aislada obtenida u obtenible usando el método de la invención. La selección y aislamiento de la célula pueden usar citometría de flujo u otro procedimiento de aislamiento de células, por ejemplo, para la identificación y aislamiento de células plasmáticas derivadas de bazo $B220^{int/+}$, $syndecan^{+}$ en las que se produce un HCAb específico de antígeno que carece de un

dominio C_H1 funcional. Sin embargo, un experto en la técnica sabe que la producción no se limita a estos tipos de células B o métodos.

La célula productora de anticuerpos de este aspecto de la divulgación se puede aislar de un órgano linfoide secundario. Por ejemplo, el órgano linfoide secundario puede ser un órgano no esplénico, por ejemplo, cualquiera del grupo que consiste en: ganglio linfático, amígdala y tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT), incluyendo el tejido linfoide asociado al intestino (GALT), tejido linfoide asociado a bronquios (BALT), tejido linfoide asociado a la nariz (NALT), tejido linfoide asociado a la laringe (LALT), tejido linfoide asociado a la piel (SALT), tejido linfoide asociado a la vascularización (VALT) y/o tejido linfoide asociado a la conjuntiva (CALT). En una realización, la célula productora de anticuerpos es una célula peritoneal. En un aspecto de la divulgación, la célula productora de anticuerpos de este aspecto de la divulgación se puede aislar de la médula ósea.

El ratón de la invención proporciona un HCAb que carece de un dominio C_H1 funcional, o un dominio V_H. El anticuerpo puede estar en una forma aislada y purificada. El anticuerpo se puede aislar y/o caracterizar usando métodos bien conocidos en la técnica. Una vez caracterizado, el HCAb o dominio V_H se puede fabricar usando métodos recombinantes o sintéticos, también bien conocidos en la técnica. Para los métodos de la técnica anterior aplicables, véanse las referencias citadas más adelante.

El ratón transgénico de acuerdo con la invención lleva un repertorio de células B de cadena pesada que comprenden HCAb que se pueden aprovechar para generar dominios V_H humanos aislados contra dianas terapéuticas. Dichos dominios V_H se pueden aislar de una serie de formas. Por ejemplo, se pueden extraer poblaciones de células linfoides que contienen células B de diversas fuentes linfoides del ratón transgénico e incluso se pueden seleccionar o estimular in vitro antes de la identificación del V_H específico de la diana. Las bibliotecas se pueden construir a partir de transcritos ex vivo clonados e investigar los dominios de unión al antígeno usando varias plataformas de presentación in vitro que incluyen, pero no se limitan a la presentación en fagos y ribosomas. Dichas bibliotecas se pueden construir a partir de ratones sin tratamiento previo o de animales inmunizados que contienen un repertorio inmunitario de maduración de afinidad reactivo contra un antígeno diana particular.

La producción del HCAb de acuerdo con los métodos de la invención puede incluir la expresión de una célula productora de anticuerpos, ya sea por expresión en la superficie celular o por secreción (es decir, liberación del anticuerpo de la célula).

El HCAb o dominio V_H se puede producir preferiblemente en un ratón a niveles fisiológicos. En una realización, el HCAb o dominio V_H se puede producir en niveles que son más altos que en el tipo natural. Como se muestra en la figura 20, el HCAb libre se puede producir en el suero de ratón con triple inactivación génica, cuando se ha introducido el transgén.

Por otra parte, como se muestra en los ejemplos, el HCAb o dominio V_H producido de acuerdo con los métodos de la invención es soluble y estable.

El HCAb o dominio V_H se puede modificar para aumentar la solubilidad, por ejemplo, por modificación genética de uno o más genes que codifican el anticuerpo. Por lo tanto, la invención también se refiere a un método para producir dominios V_H solubles usando el ratón de la invención de acuerdo con la reivindicación 15. Los dominios V_H son solubles, no se agregan, tienen una alta termoestabilidad y afinidad. En una realización, el método para producir dominios V_H solubles comprende las siguientes etapas:

a) expresar un vector de la invención en un ratón transgénico,

b) aislar una célula o tejido que exprese un HCAb,

c) clonar la secuencia que codifica el dominio V_H del ARNm derivado de la célula o tejido aislado,

d) construir una biblioteca a partir de transcritos clonados y

e) aislar el dominio V_H.

Como se explica en otra parte, el ratón es preferiblemente un ratón con triple inactivación génica que no produce ninguna cadena ligera o pesada endógena funcional.

Las bibliotecas construidas se pueden usar en técnicas de selección por presentación para aislar el dominio V_H. Las técnicas de selección por presentación incluyen la presentación en fagos, presentación en levaduras o ribosomas.

En una etapa adicional, el dominio V_H se puede expresar en un sistema de expresión, por ejemplo, un sistema de expresión microbiano o de mamífero.

En una etapa adicional, los dominios V_H se pueden ensayar para determinar la afinidad. Esto se puede llevar a cabo por una serie de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a ELISA y BIAcore. Además, la unión a antígenos de superficie celular se puede medir por separación de células activadas por fluorescencia (FACS). La afinidad del dominio V_H aislado por el antígeno diana es un parámetro crucial para determinar si es probable que un dominio V_H candidato avance más en el desarrollo como candidato terapéutico. La afinidad se mide habitualmente por la constante de disociación K_d (K_d = [anticuerpo][antígeno]/[complejo anticuerpo/antígeno]) en unidades molares (M). Un valor alto de K_d representa un anticuerpo que tiene una afinidad relativamente baja por un antígeno diana. A la inversa, una K_d baja, a menudo en el intervalo de sub-nanomolar (nM) indica un anticuerpo de alta afinidad.

Además de la fuerza de la unión al antígeno diana, también se puede ensayar la capacidad de un V_H para influir en la función de una diana dada.

En una realización, el método también incluye la etapa de inmunizar animales con un antígeno diana para producir una respuesta inmunitaria, comprendiendo la respuesta inmunitaria la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Sin embargo, las bibliotecas también se pueden construir a partir de animales sin tratamiento previo.

Se puede usar una variedad de protocolos de inmunización para dirigir las respuestas de HCAb dentro de los animales transgénicos. Los procedimientos más habitualmente usados se basan en la administración de dianas basadas en proteínas junto con un adyuvante. Las dianas a menudo están en forma purificada, pero también se pueden usar preparaciones de antígeno brutas. Las células también se pueden usar como una fuente de antígeno, donde la diana deseada es expresada por la célula de forma natural o como resultado de manipulaciones genéticas. También se puede usar ADN como fuente de inmunógeno. En este caso, se usa a menudo un plásmido de expresión combinado con adyuvante molecular o de citoquina con transfección in vivo que da lugar al inmunógeno proteína. Durante y después de la inmunización, las respuestas de HCAb se pueden vigilar aplicando (por ejemplo) una técnica ELISA en suero o ELISpot.

Además de los métodos del descubrimiento basados en bibliotecas, se puede usar la tecnología de hibridoma cuando se fusionan células B ex vivo (dentro de una población linfoide o preseleccionada) con una célula de mieloma pareja para crear hibridomas monoclonales que producen HCAb que se pueden cribar de acuerdo con las propiedades de unión deseadas. Las secuencias de V_H después se pueden clonar a partir de los hibridomas y convertir al formato final deseado.

Un aspecto que no forma parte de la invención es un método para producir dominios V_H solubles que comprenden las siguientes etapas:

a) expresar un vector de la invención en un ratón transgénico,

b) aislar una célula o tejido que expresa un HCAb,

c) producir un hibridoma a partir de dicha célula,

d) aislar el dominio V_H.

Un aspecto que no forma parte de la invención es un hibridoma que se puede obtener por fusión de una célula productora de HCAb o célula productora de dominio V_H tal como se define en la presente memoria con una célula B de línea celular tumoral. La célula productora de anticuerpos usada para formar el hibridoma es una célula de órgano linfoide secundario no esplénica (véase más arriba). Métodos bien conocidos para generar y seleccionar hibridomas de un solo clon para la producción de anticuerpos monoclonales se pueden adaptar para su uso.

Un aspecto que no forma parte de la invención son los HCAb, anticuerpos derivados de los mismos o sus fragmentos obtenidos u obtenibles por métodos descritos en la presente memoria. Por consiguiente, la divulgación proporciona un HCAb producido en un ratón, o un fragmento del mismo obtenido o derivado de un ratón que expresa un vector de la invención. En un aspecto, el fragmento derivado del ratón de la invención, preferiblemente un ratón transgénico TKO, es un dominio V_H.

El HCAb o dominio V_H puede ser específico para un antígeno. El HCAb o dominio V_H se puede modificar genéticamente para ser un anticuerpo bivalente o multivalente con una o más especificidades.

El HCAb puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo similar a IgG o un anticuerpo similar a IgM. El HCAb o dominio V_H producido por los métodos y el ratón de la invención se pueden usar como un agente de diagnóstico, pronóstico o generación de imágenes terapéutico. El HCAb o dominio V_H se puede usar adicional o alternativamente como un agente de unión intracelular, o una abzima.

Un aspecto que no forma parte de la invención es un medicamento, formulación farmacéutica o composición que comprende un HCAb o dominio V_H como se describe en la presente memoria y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. El medicamento se formulará típicamente usando métodos bien conocidos antes de la

administración a un paciente. Por lo tanto, la divulgación se refiere a una composición que comprende un dominio V_H obtenido u obtenible por el método de la invención. La composición comprende el dominio V_H solo o en combinación con otro dominio V_H, proteína, u otra molécula de beneficio terapéutico. Los ejemplos no limitantes se citan más adelante.

En un aspecto, la conjugación puede ser con un resto tóxico (carga útil) para formar un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) o con un radionúclido para formar un radioinmunoconjugado con el objetivo de usar la unión del dominio V_H humano a su antígeno diana in vivo para administrar el resto tóxico en una ubicación extracelular o intracelular. Por lo tanto, el dominio V_H guía la carga útil tóxica a la célula diana (que puede ser una célula cancerosa) donde la carga útil puede desplegar su actividad citotóxica y matar a la célula. El resto tóxico se puede fusionar directamente al dominio V_H. En otro ejemplo, el resto tóxico se puede acoplar químicamente al dominio V_H ya sea directamente o por un conector. El conector puede comprender un péptido, un oligopéptido o polipéptido, cualquiera de los cuales puede comprender aminoácidos naturales o no naturales. En otro ejemplo, el conector puede comprender un conector sintético. El conector puede ser escindible o no escindible. Típicamente, los conectores están unidos a la molécula de unión al antígeno por los grupos amino de los restos de lisina, o por los grupos tiol en restos de cisteína. El experto en la técnica conoce una serie de conectores, que se describen, por ejemplo, en Ducry et al, *Bioconjugate Chem*. 2010, 21, 5-13 y WO 2004/01095. En otra realización, el dominio V_H se fusiona con una región Fc o parte de la misma.

En un ejemplo de la composición, al menos dos dominios V_H se fusionan entre sí en línea o se acoplan o conjugan por métodos conocidos en la técnica. Los dominios V_H se pueden unir al mismo antígeno diana o diferentes antígenos.

Un aspecto que no forma parte de la invención es un dominio V_H para usar como un medicamento en el tratamiento de una enfermedad.

Un aspecto que no forma parte de la invención son métodos para tratar una afección médica, que comprenden la administración de un dominio V_H de la divulgación a un paciente que lo necesite.

Las enfermedades que son susceptibles de tratamiento usando un anticuerpo de acuerdo con la divulgación incluyen, pero no se limitan a: curación de heridas, trastornos proliferativos celulares, incluyendo neoplasma, melanoma, de pulmón, colorrectal, osteosarcoma, recto, ovario, sarcoma, cuello uterino, esofágico, mama, páncreas, vejiga, cabeza y cuello y otros tumores sólidos; trastornos mieloproliferativos, tales como leucemia, linfoma no Hodgkin, leucopenia, trombocitopenia, trastorno de angiogénesis, sarcoma de Kaposi; trastornos autoinmunitarios/inflamatorios, que incluyen alergia, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis, psoriasis e inflamación del tracto respiratorio, asma, trastornos inmunitarios y rechazo de trasplante de órgano; trastornos cardiovasculares y vasculares, que incluyen hipertensión, edema, angina, aterosclerosis, trombosis, septicemia, choque, lesión por reperfusión e isquemia; trastornos neurológicos que incluyen enfermedad del sistema nervioso central, enfermedad de Alzheimer, lesión cerebral, esclerosis lateral amiotrófica y dolor; trastornos del desarrollo; trastornos metabólicos que incluyen diabetes mellitus, osteoporosis y obesidad, SIDA y enfermedad renal; infecciones que incluyen infección viral, infección bacteriana, infección fúngica e infección parasitaria, afecciones patológicas asociadas con la placenta y otras afecciones patológicas. Las rutas de administración adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica.

Un aspecto que no forma parte de la invención es un HCAb que carece de un dominio C_H1 funcional, que comprende V_H humano y regiones constantes de ratón.

La invención incluye construcciones de vectores como se han descrito antes en la presente memoria con referencia a uno o más de los dibujos. En un aspecto, la invención se refiere a un vector como se muestra en la fig. 10.

La invención se describe además en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de YAC

1.1 Materiales

Vectores:

pYAC3 (de Bruschi, ICGEB, Yeast Molecular Genetics Group, Trieste, ITALIA)

pYNOT (derivado de pYAC3 sustituyendo el marcador *URA3* por *LEU2*. De Bruschi, ICGEB, Yeast Molecular Genetics Group, Trieste, ITALIA)

pHTK (derivado de pYNOT sustituyendo el marcador *LEU2* por *HIS3*)

pHKT-Hy (un gen resistente a higromicina (Hy) insertado en pHKT)

pYES1L (invitrogen)

Cepas de levaduras

YLBW1 (Hamer et al., 1995), AB1380 (Markie, 2006).

1.2 Conversión de BAC en YAC

Los BAC (cromosomas artificiales bacterianos en un formato circular) son herramientas bien conocidas en la técnica que facilitan la manipulación (p. ej., la secuenciación y clonación) de segmentos de ADN de ~150 kpb-350 kpb de tamaño (*Methods in Molecular Biology*, Volumen 54 y 349). Los BAC que contienen ADN derivado del locus de inmunoglobulina de la cadena pesada de seres humanos o ratones son numerosos y bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de dichos BAC (también citados en las fig. 1 y 2) incluyen, pero no se limitan a:

De ser humano:

- RP11-1065N8
- RP11-659B19
- RP11-14117
- RP11-72N10
- RP11-683L4
- RP11-12F16

Murino:

- RP23-354L16
- RP24-72M1

También es bien sabido en la técnica que los BAC se pueden usar para facilitar la unión molecular secuencial de múltiples segmentos de ADN que comprenden secuencia que se solapa (complementaria) para crear moléculas de ADN mucho más grandes. Uno de dichos métodos para lograr esto, BIT (translocación inducida por puente), requería que los BAC se convirtieran primero en un formato lineal sin solapamiento en levaduras como cromosomas artificiales de levadura (YAC).

Conversión de BAC por clonación por recombinación asociada a transformación (TAR) La conversión de BAC y las manipulaciones de YAC son técnicas bien consolidadas descritas en la técnica, por ejemplo, en *YAC Protocols* (*Methods in Molecular Biology*, Volumen 54 y 349), en los que se describen en detalle las recetas y los métodos para marcadores auxotróficos, selección de levaduras, medios, transformación de levaduras, cribado de YAC, transferencia de YAC, modificación y amplificación de YAC.

Brevemente, dos secuencias de anclaje el anclaje 1 (a1) y el anclaje 2 (a2) que flanquean la secuencia que no solapa para ser retenida del BAC para una posterior unión, se amplificaron por PCR con sitios de restricción genéticamente modificados (*Sal*I y *Sph*I) al final de los cebadores de la PCR para la clonación en el vector pYAC3 (http://genome-www.stanford.edu/vectordb/vector_descrip/COMPLETE/PYAC3.SEQ.html) (fig. 3). Los requisitos de diseño para dichas secuencias de anclaje son bien conocidos en la técnica (p. ej., Alasdair MacKenzie, 2006, *YAC protocols*, 2ª edición). a1 y a2 digeridas por las enzimas de restricción se clonaron secuencialmente en pYAC3 (fig. 3). El vector pYAC3-a1-a2 se digirió posteriormente con *Sph*I y *Bam*HI, generando dos brazos de YAC, a1-URA3-telómero y a2-centrómero-TRP1-telómero. La levadura que llevaba el BAC original se transformó con estos dos brazos de YAC, se puso en placa en medio de levadura sin triptófano y uracilo y se incubó a 30ºC durante tres días. La recombinación homóloga entre los brazos YAC y BAC en la posición de los anclajes produjo el YAC convertido (fig. 4). Se cribó el producto convertido correcto de los transformantes por PCR de las uniones y por electroforesis en gel de campo de pulso (PFGE) según el tamaño. Los YAC que no solapaban que comprenden la secuencia de ADN adyacente para unirse posteriormente se ensamblaron por BIT.

Unión de dos YAC que no solapan por BIT

Se construyó un casete del gen de resistencia a la kanamicina *KAN*^{R} añadiendo a cada extremo un sitio de FRT y un fragmento de 65 bp de secuencia homóloga de YAC específica para los dos extremos de YAC para la unión (fig. 5). Este casete se transformó en levadura que contenía los dos YAC que se iban a unir. Los clones resistentes a kanamicina se caracterizaron además por PCR y transferencia Southern para confirmar la unión satisfactoria. Después el gen *KAN*^{R} se extrajo usando la recombinasa FLP. El ADN en la región de unión se secuenció y se confirmó la existencia de una "cicatriz" de ADN que contenía la secuencia de FRT en el sitio de unión. En cada etapa de la manipulación de YAC, se aplicó PFGE para confirmar el tamaño del YAC. La unión secuencial de los YAC que

comprendían secuencia adyacente del locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana original se usó para generar una serie de construcciones de YAC cada una con los genes de C, D y J humanos y un número creciente de genes de V.

1.3 Construcción de la región C con elementos de ratón.

Con el fin de mejorar la eficacia de la respuesta inmunitaria dirigida por las construcciones de YAC, cada una se modificó posteriormente para sustituir los genes de la región C humana por elementos de la región constante de la cadena pesada murina.

Usando la capacidad de la levadura para captar y recombinar de manera eficaz los fragmentos de ADN que solapan (Gibson et al, 2008), se usaron múltiples fragmentos que solapaban para añadir el potenciador μ murino, el elemento de cambio μ murino y el gen γ1 constante murino (este último con el dominio CH1 eliminado) al extremo 3' del último gen de J humano, con el fin de crear construcciones de YAC con un solo gen constante. Posteriormente, se adoptó un planteamiento similar para crear una construcción de YAC que comprende múltiples genes constantes murinos Cγ1, Cγ2b y Cγ2a, todos con dominios C_H1 eliminados.

1.3.1 YAC con un solo gen de C murino

Preparación de fragmentos de ADN para la transformación de levaduras.

El potenciador μ de ratón y el elemento de cambio μ

Cebador directo: GACATTCTGCCATTGTGATTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGGCAA GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAAT (SEQ ID NO.1). Los primeros 69 pb de este cebador son de J6 humano (ID: J00256, http://www.imgt.org/IMGTlect/?query=201+J00256). Los últimas 24 pb de este cebador son complementarios de la secuencia de ratón 3' respecto a J4. Cebador inverso: TTGAGGACCAGAGAGGGATAAAAGAGAAATG (SEQ ID NO. 2), este cebador es complementario inverso de la región 5' respecto de C_H1 de IGHμ del ratón (fig. 6). La PCR con estos dos cebadores usando BAC RP23-354L16 como molde generó un fragmento de 5,8 kb que cubría el potenciador μ de ratón y la región de cambio μ con un extremo homólogo a la región J6 humana.

El gen Cγ1 de ratón con C_H1 eliminado

Cebador directo: AGAGGACGTATAGGGAGGAGGGGTTC (SEC ID NO. 3); Cebador inverso: AACACCTTCAGCGATGCAGAC (SEC ID NO. 4). El producto de la PCR de 7,8 kb con estos dos cebadores que usan BAC RP23-354L16 como molde cubre toda la región transcrita a Cγ1 de ratón, excepto el exón C_H1 (fig. 7).

Los conectores que unen los fragmentos que no solapan Eμ, Cγ1 y brazo de YAC

Conector 1 para fragmentos Eμ y Cγ1:

TCATGCCCCTAGAGTTGGCTGAAGGGCCAGATCCACCTACTCTAGAGGCATCTCT
CCCTGTCTGTGAAGGCTTCCAAAGTCACGTTCCTGTGGCTAGAAGGCAGCTCCAT
AGCCCTGCTGCAGTTTCGTCCTGTATACCAGGTTCACCTACTACCATATCTAGCCC
TGCCTGCCTTAAGAGTAGCAACAAGGAAATAGCAGGGTGTAGAGGGATCTCCTGT
CTGACAGGAGGCAAGAAGACAGATTCTTACCCCTCCATTTCTCTTTTATCCCTCTC
TGGTCCTCAGAAGAGGACGTATAGGGAGGAGGGGTTCACTAGAGGTGAGGCTCA
AGCCATTAGCCTGCCTAAACCAACCAGGCTGGACAGCCATCACCAGGAAATGGAT
CTCAGCCCAGAAGATCGAAAGTTGTTCTTCTCCCTTCTGGAGATTTCTATGTCCTT
TACACTCATTGGTTAATATCCTGGGTTGGATTCCCACACATCTTGACAAACAGAGA
CAATTGAGTATCACCAGCCAAAAGTCATACCCAAAAACAGCCTGGCAT (SEQ ID NO. 5). Para preparar el conector 1, PCR1 (313 pb, cebador1 F: TCATGCCCCTAGAGTTGGCTG; cebador1 R: GAACCCCTCCTCCCTATACGTCCTCTTTGAGGACCAGAGAGGGATAAAAGAGAAA TG (SEQ ID NO. 6)) y PCR2 (258 pb, cebador2 F: AGAGGACGTATAGGGAGGAGGGGTTC (SEQ ID NO. 7); cebador2 R: ATGCCAGGCTGTTTTTGGGTA (SEQ ID NO. 8)) se sintetizaron usando BAC RP23-354L16 como molde. PCR1 y PCR2 con secuencias que solapan se ensamblaron al conector 1 por PCR de fusión usando el cebador1 F y el cebador2 R.

Conector 2 para fragmentos Cγ1 y brazo de YAC:

TACATCTTTTTTCCTCTCTGTCTGCATCGCTGAAGGTGTTTCGTCGCCGCACTTAT
GACT GTCTTCTTTA TCATGCAACT (SEQ ID NO. 9)

Brazo de YAC

Se generó un brazo de YAC de 5,7 kb con marcador del gen *LEU2* por digestión del vector pYNOT (fig. 8, derivado de pYAC3 sustituyendo el *URA3* por el marcador *LEU2*) con las enzimas de restricción *Psh*AI y *Bam*HI.

Sustitución de la región C humana por la región C de ratón por recombinación homóloga de levaduras

Usando la transformación de esferoplastos de levaduras (Sanchez y Lanzer, 2006) se introdujeron 5 fragmentos (Eμ murino, Cγ1 murino, brazo de YAC, conector 1 y conector 2) en la cepa YLBW1 de levadura que lleva el YAC que comprende una región C humana. Los transformantes se seleccionaron en medio sin triptófano y leucina. La recombinación homóloga entre la secuencia que se superponían en J6 humano dio como resultado la sustitución de los genes humanos por Eμ y Cγ1 de ratón. El nuevo YAC se caracterizó por PCR y secuenciación de los sitios de unión.

Adición del potenciador 3'

Clonación del fragmento potenciador 3' de 42 kb en el vector BAC-YAC

El potenciador 3' de ratón contiene los elementos hs3A, hs1.2, hs3B, hs4, hs5, hs6 y hs7 distribuidos en una región 3' de 42 kb hasta el último gen constante Cα. Para añadir el potenciador entero a un sitio 3' del gen Cγ1, se subclonó un fragmento MfeI de 42 kb que cubría todos los elementos potenciadores en un vector de *BAC-YAC* pYES1L (Invitrogen) siguiendo las instrucciones proporcionadas por invitrogen. La construcción se caracterizó completamente por PCR, PFGE y secuenciación. La digestión con *Mfe*I liberó el fragmento de 42 kb del vector para la posterior transformación de levaduras.

Preparación del brazo de YAC de higromicina-HIS3.

Se construyó un vector YAC (pHKT-Hy, fig. 9) por inserción de un gen resistente a higromicina (Hy) en pHKT (derivado de pYNOT sustituyendo el marcador *LEU2* por *HIS3*). La doble digestión de este vector con *Spe*I y *Bam*HI generó un fragmento de brazo de YAC de 6,2 kb que contenía Hy-*HIS3*-telómero.

Los conectores que unen el fragmento del potenciador 3' al gen Cγ1 de ratón y Hy-HIS3 brazo de YAC

Conector 1 (626 pb) para Cγ1 de ratón y potenciador 3' de 42 kb

ACGGCTCAGGAGGAAAAGGCACTCTGTGTGGAGCTCTTCAGTGGGTATGAAATG
GTGATGGAGAAGCCCAGGTGCACTGAAAATCCAGGAGCTGAATTTGATCACCAGG
ACGCATATGGTAGAGAGGAAAATGAATTGATTCCCAAATGTTCTCCTCTATGTGTG
CACCGTGGCATGTGCATGCACACAATTACACATAAACACATTCAACATAAATACAA
CACACATATACACGCTGCACACACATACACACACAGAACACACACCACACACACA
CACCACACACAATCACACACATATTCCACACAGTACACCACAAACATCTATACACA
CCACACACACACAGACACACACACACACACATTCATACACAGCACAACACAAACAT
CTATACACAACACACACACAATACACATAGTCACACGCATATTCACTCACACACAT
ATTCACCCACACACAATCATACATAGACACATTCAACATAAACACAACACCACACA
CACACACACTTGCACACACAAATGTAATGATTTTTTTAAGGACTACATCTTTTTTCC
TCTCTGTCTGCATCGCTGAAGGTGTTCAATTGCCAAAATCACAGGTGAGCCCAGA TGCATACCCGGGAC (SEQ ID NO. 10). Para preparar el conector 1, PCR1 (604 pb, cebador1 F: ACGGCTCAGGAGGAAAAGGCAC (SEQ ID NO. 11); cebador 1 R: TCACCTGTGATTTTGGCAATTGAACACCTTCAGCGATGCAGAC (SEQ ID NO. 12)) se sintetizó usando BAC RP23-354L16 como moldes. Después PCR1 se extendió hasta 626 pb mediante el cebador1 F y cebador R:

GTCCCGGGTATGCATCTGGGCTCACCTGTGATTTTGGCAATTG (SEQ ID NO. 13).

Conector 2 (766 pb) para potenciador 3' de 42 kb y Hy-*HIS3* brazo de YAC

GAGGTACAGGGGGCTCATGGGTTTATAAGTTCAGGTTTATACCAAGGTTTCGGGG
GGTAGCCTGAGGCTCATGTACCTTCTTGTGGTAGCCCCCAGGTTCTGTGCATGGT
ACTGCTCAGTTACTGGCATGGCTTCTGGGAAGGCTGGGCTCCCACGTCCCCTGT
GGACACATGGTTACGCCAAGAACAGAACTACAAAGTTAGGAGTTACCATTCCCAC
CTGCACCTGTATCTCCAGTACCTGGGTTTCTAAGACGTAGTGAGTCCTCTTGCCAA
CCAGGGTCTGCCACAATGGTCAGGCACAGCTGTGGGCCGGTCAGCCCCATCAGG
TCACACCAGCAGGTCCCAGGAGCACAGAGCTTAAATGCCCCCTAGTGTCCCTAGT
GAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAG
AAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGG
GGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGG
GGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGG

TTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTC
TTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACG
TGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTT

GCGC (SEQ ID NO. 14). Para preparar el conector 2, PCR1 (379 pb, cebador1 F: GAGGTACAGGGGGCTCATGGGT (SEQ ID NO. 15); cebador1 R: AGCCTCACTAG GGACACTAGGGGGCATTTAAGC (SEQ ID NO. 16)) y PCR2 (387 pb, cebador2 F: CCCTAGTGTCCCTAGTGAGGCTCCGGTGCCCGT (SEQ ID NO. 17); cebador2 R: GCGCAAGGCCTCGAACTCTC (SEQ ID NO. 18)) se sintetizaron usando BAC RP23-354L16 y BAC RP24-72M1como moldes, respectivamente. PCR1 y PCR2 con secuencias que solapaban se ensamblaron generando el conector 2 por PCR de fusión usando el cebador 1 F y el cebador 2 R.

Transformación de levaduras

Se introdujeron 4 fragmentos (potenciador 3', Hy- *HIS3*- telómero brazo de YAC, conector 1 y conector 2) en la cepa YLBW1 de levadura que contiene YAC para la adición del potenciador 3' por transformación de esferoplastos de levaduras. Los transformantes se seleccionaron en medio sin triptófano e histidina. La recombinación homóloga entre los fragmentos que solapaban dio como resultado la adición del potenciador 3' y Hy-*HIS3*-brazo de telómero al YAC de elección, generando Crescendo YAC1 o YAC2 (fig. 10). El nuevo YAC se caracterizó por PCR y secuenciación de los sitios de unión. El tamaño del nuevo YAC fue confirmado por PFGE y transferencia Southern.

1.3.2 YAC con múltiples genes constantes

Además de los YAC que contienen un gen Cγ1 de ratón, se diseñaron otros YAC para incluir múltiples genes constantes, los genes constantes de ratón Cγ1, Cγ2b y Cγ2a, todos con el dominio C_H1 eliminado (fig. 10).

Generación de un fragmento de 45 kb que contiene Cγ2b y Cγ2a con C_H1 eliminado.

Usando los cebadores citados a continuación, se amplificaron 7 fragmentos de PCR que solapaban usando RP24-72M1 como molde. El fragmento 3 se sintetizó por PCR de fusión con Cγ2b (C_H1 eliminado); y el fragmento 6 se sintetizó por PCR de fusión con Cγ2a (C_H1 eliminado).

Cebadores usados para las 7 PCR:

Fragmento 1: 45 k-1 8057 pb

Directo: GGTTGGATTCTATCTTCGCATGG (SEQ ID NO. 19)

Inverso: TGGGTCCTGTCTTTCTACCTTTG (SEQ ID NO. 20)

Fragmento 2: 45 k-2 8304 pb

Directo: GCTCCTTGCTGGGTCTTAATGTT (SEQ ID NO. 21)

Inverso: TTAGAACCGTGTCTTCTACAATTGA (SEQ ID NO. 22)

Fragmento 3: 45 k-3 1,3 kb $C_H1\Delta$

45 k-3-izquierda

Directo: GGGTAGGAGGTTGTTGGTTA (SEQ ID NO. 23)

Inverso: CCCGCTGGGCTCTGCAAGAGAGGAGAATGTGTGA (SEQ ID NO. 24)

45 K-3-derecha

Directo: CTCTCTTGCAGAGCCCAGCGGGCCCATTTCA (SEQ ID NO. 25)

Inverso: GCTTGTTTTTATATCGAGCTTGC (SEQ ID NO. 26)

Fragmento 4: 45 k-4 8412 pb

Directo: TCAGTCTCACTTGCCTGGTCGT (SEQ ID NO. 27)

Inverso: CTTTGTAGCACATGCGTCATCC (SEQ ID NO. 28)

Fragmento 5: 45 k-5 9012 pb

Directo: TGAAGGCATGAAGGAGTTGAGC (SEQ ID NO. 29)

Inverso: ACAACCCCCTATCCTACACATT (SEQ ID NO. 30)

Fragmento 6: 45 k-6 2274 b $C_H1\Delta$

45 k-6-izquierda

Directo: GGGTCCTGGCAACATTAGCG (SEQ ID NO. 31)

Inverso: CACTCTGGGCTCTGCAAGAAAGGAGGATGTGTGA (SEQ ID NO. 32)

45k-6-derecha

Directo: CTTTCTTGCAGAGCCCAGAGTGCCCATAACAC (SEQ ID NO. 33)

Inverso: TGGTGTTCAGCAGGCTAATTTG (SEQ ID NO. 34)

Fragmento 7: 45 k-7 9968 pb

Directo: CAGGCCCCACTTCTTTACCTAA (SEQ ID NO. 35)

Inverso: TTGTTAGTTCATCACAGGGCAATTC (SEQ ID NO. 36)

Los 7 productos de la PCR y el vector BAC-YAC linealizado con secuencias que solapan con el fragmento 1 y 7 en los extremos se transformaron en levaduras para la recombinación homóloga. El 45kb-YAC se confirmó por PCR de las uniones, PFGE y secuenciación. La enzima de restricción PmeI libera el fragmento de 45 kb del YAC circular.

Generación del fragmento de 58 kb que contiene Cγ1, Cγ2b y Cγ2a con C_H1 eliminado.

El potenciador μ de ratón y el fragmento de cambio μ, el fragmento Cγ1 con CH1 eliminado y el conector 1 (1.3.1), el fragmento de restricción PmeI de 45 kb que contiene Cγ2b y Cγ2a y el vector BAC-YAC linealizado con secuencias que solapan con 5' del fragmento potenciador μ y 3' del fragmento de 45 kb en los extremos, se transformaron en levaduras para recombinación homóloga. El 58kb-YAC se confirmó por PCR de las uniones, PFGE y secuenciación. La enzima de restricción PmeI libera el fragmento de 58 kb del YAC circular.

Transformación en levaduras para YAC con múltiples genes constantes.

Dos fragmentos, uno de 58 kb que comprende Cγ1-Cγ2b-Cγ2a y el otro un brazo de YAC con una secuencia que solapa con el extremo 3' del fragmento de 58kb, se introdujeron en levaduras que contienen YAC destinadas a la adición de los genes Cγ1-Cγ2b-Cγ2a por transformación en esferoplastos. Los transformantes se seleccionaron en medio sin aminoácidos que depende de los marcadores auxotróficos que lleva el brazo de YAC. La recombinación homóloga entre los fragmentos que solapan dio como resultado la adición del fragmento Cγ1-Cγ2b-Cγ2a y el nuevo brazo de YAC al YAC de elección. El nuevo YAC se caracterizó por PCR y secuenciación de los sitios de unión. El tamaño del nuevo YAC se confirmó por PFGE y transferencia Southern. Posteriormente, se añadió el potenciador 3' de ratón de 42 kb (como se ha descrito antes) generando Crescendo YAC3 (fig. 10).

Ejemplo 2: Generación de ratones con inactivación génica

Los métodos usados para silenciar el locus de la cadena pesada de ratón (WO2004/076618 + Ren, L., et al., *Genomics* 84 (2004), 686-695), el locus lambda de ratón (Zou, X., et al., EJI, 1995, 25, 2154-2162 y WO2003/000737) y el locus kappa (Zou, X., et al., JI 2003 170, 1354-1361 y WO2003/000737) se han descrito previamente. Brevemente, las eliminaciones a gran escala de la región constante de la cadena pesada de ratón y el locus de la cadena lambda de ratón dieron como resultado el silenciamiento de estas dos cadenas de inmunoglobulina. La cadena ligera kappa se silenció por una inserción dirigida de un casete de resistencia a neomicina.

a) Cruce de ratones KO de la cadena pesada y ligera

Se crearon ratones con doble silenciamiento de las cadenas ligeras endógenas (kappa y lambda) por reproducción convencional (Zou, X., et al., JI 2003 170, 1354-1361). Estos ratones KO (inactivación génica) de la cadena ligera se criaron adicionalmente con ratones KO de la cadena pesada para dar animales heterocigotos triples para la reproducción para obtener una línea de triple inactivación génica (TKO). Esta línea demostró ser fértil y se mantiene como una línea de verdadera reproducción.

b) Genotipado de la progenie del cruce

Los cebadores se diseñaron para permitir la discriminación entre los locus de tipo natural y silenciado para cada una de las regiones de cadena pesada, ligera kappa y lambda endógenas. El ADN genómico se extrajo de biopsias de la cola o la oreja tomadas de crías y se usó para el ADN molde en las reacciones de PCR. El ADNg se extrajo usando

métodos bien descritos (p. ej., usando el reactivo de lisis Viagen Direct PCR (cola) cat. nº 102-T, de acuerdo con las instrucciones del fabricante). Los siguientes cebadores (adquiridos de Sigma) se usaron en las reacciones de PCR.

Cebadores de la cadena pesada

Igh-Cdel-F	AGAGCCCCCTGTCTGATAAGAATCTGG (SEQ ID NO. 37)
Igh-Cdel-R	GAGTCCCCATCCCCAAGGCTGG (SEQ ID NO. 38)
Igh-WT1027-long	GATGGTGAAGGTTAGGATGTCTGTGGAGGGAC (SEQ ID NO. 39)
Tamaños de los productos de la PCR: WT: 1027 pb KO: 613 pb HET: 1027 y 613 pb	

Cebadores de Kappa

TPMoKfor	CCATCTTCCCACCATCCAGTGAGC (SEQ ID NO. 40)
TPMoKrev	GCAACAGTGGTAGGTCGCTTGTGG (SEQ ID NO. 41)
Tamaños de los productos de la PCR de kappa: WT: 400 pb KO: 1700 pb HET: 400 pb y 1700 pb	

Cebadores de Lambda

LJ2B FW	GGAGATCAGGAATGAGGGACAAAC (SEQ ID NO. 42)
LC1 RV	GCCTTTCCCATGCTCTTGCTG (SEQ ID NO. 43)
Lamgen WT rev2	GGCAGGAAAGAAGGGTTAAGAT (SEQ ID NO. 44)
Tamaños de los productos de la PCR de lambda: WT: 1127 pb KO: 686 pb HET: 1127 pb y 686 pb	

Estos cebadores se pueden usar con varias enzimas de ADN polimerasa y tampones y las condiciones de ciclado se pueden adaptar para adecuarse a la enzima particular. Como ejemplo, se puede usar la mezcla Fermentas DreamTaq-Ready (nº K1081) de la siguiente manera;

	ul/reacción
2 x Dream Taq	10
Cebadores (10 uM)	0,2 de cada (x5)
H_2O hasta 19 ul	8
Se usa 1 ul de molde para las reacciones. Se incluyeron siempre un control positivo y un control de agua dentro de las muestras que se iban a genotipar.	

Se usaron las siguientes condiciones de ciclo para esta enzima particular;

94°C 2 min
94°C 30 s
60°C 30 s } x 30
72°C 1 min
72°C 5 min

Después de las reacciones de PCR, los productos se visualizaron usando un colorante de ADN después de electroforesis en un gel de agarosa al 1%. La figura 11 muestra los resultados de un experimento de genotipado representativo con ADN genómico extraído de 2 animales con genotipos wt (tipo natural), KO de la cadena pesada, KO de cadena ligera o TKO.

c) Falta de expresión de inmunoglobulina endógena en ratones TKO

El fenotipo nulo del ratón TKO se confirmó usando ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) específicos para cadenas pesadas, complejos de cadena pesada/cadena ligera y cadenas ligeras de ratón. Brevemente, las placas de inmunosorción (p. ej., placas de pocillos Nunc Maxisorb 96F, cat. nº 443404) se recubrieron con una solución de anticuerpos de captura 5 µg/ml, diluidos en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de lavado con PBS/Tween al 0,05%, PBS y el bloqueo con una solución de leche en polvo al 3%, se aplicaron diluciones de suero (en leche en polvo al 3%/PBS) a las placas. Después de lavar la proteína no unida, las proteínas unidas se detectaron usando una solución de anticuerpo de detección biotinilado adecuada, usada en una dilución óptima predeterminada, seguida de visualización con neutravidina-HRP. Se pueden usar diferentes anticuerpos disponibles en el mercado para estos ELISA. La tabla 1 da ejemplos de dichos anticuerpos.

TABLA 1 Anticuerpos usados en ELISA

ELISA	Anticuerpo de captura	Anticuerpo de Detección
Cadena pesada de ratón	Jackson 115-005-164, AffiniPure de cabra anti-IgG de ratón (subclases 1+2a+2b+3), Frag. espec. Fcγ	Amersham RPN1001V, biotina anti-Ig de ratón
Complejos de cadena pesada/cadena ligera	Jackson 115-005-164, AffiniPure de cabra anti-IgG de ratón (subclases 1+2a+2b+3), Frag. espec. Fcγ	Jackson 115-065-174, fragmento de AffiniPure F(ab')2 conjugado con Biotina-SP, de cabra anti-IgG de ratón, específico de cadena ligera
Cadenas ligeras	BD 559748 y BD 553432, de rata anti-Ig kappa de ratón, clon 187.1 y de rata anti-Ig lambda de ratón 1,2,3.	Jackson 115-065-174, fragmento de AffiniPure F(ab')2 conjugado con Biotina-SP, de cabra anti-IgG de ratón, específico de cadena ligera

Como se pone de manifiesto en la figura 12, se mostró que los ratones TKO carecen de cadenas de inmunoglobulina endógenas detectables. Se analizaron muestras de suero de cada uno de 2 ratones de tipo natural y 2 ratones TKO.

d) Aislamiento y cultivo de células ES

El aislamiento de citoblastos embrionarios se ha descrito (Ying, Q.L. et al., *Nature*, 453, 519-523, 2008, Nichols, J. et al., *Development*, 1136, 3215-3222, 2009, Nagy, K. y Nichols, J., "Derivation of Murine ES Cell Lines", pág. 431 - 455 en "Advanced Protocols for Animal Transgenesis. An ISTT Manual. Ed. Shirley Pease & Thomas L. Saunders). El método 2i aprovecha las moléculas pequeñas inhibidoras que bloquean la ruta de señalización de FGF/Erk, manteniendo las células ES en un estado indiferenciado. Además, la incubación de embriones en etapa temprana en medio que contiene estos inhibidores desvía la masa intracelular del embrión hacia el linaje epiblasto, impidiendo el desarrollo del hipoblasto que induce diferenciación. Esto proporciona un compartimento enriquecido en epiblastos del cual se pueden derivar más fácilmente líneas celulares de ES.

Las líneas celulares de ES se han derivado de embriones TKO. Los embriones TKO en etapa temprana se descongelaron de la crioconservación y se cultivaron, como se define en los métodos de referencia, hasta que

alcanzaron la etapa de blastocisto. Después se cultivaron durante 2 días más antes de la liberación del epiblasto, que se realizó por eliminación del trofectodermo usando suero anti-IgG de ratón y complemento. Después el epiblasto se expandió antes de la desagregación en solución de tripsina y expansión de las líneas celulares de ES resultantes. Los medios de cultivo para la propagación de líneas celulares de ES y clones están bien descritos. En el presente caso, las líneas de ES se mantuvieron en medio 2i o se separaron gradualmente en medio complementado con LIF y suero.

Ejemplo 3: Transgénesis

a) Microinyección pronuclear.

La técnica de microinyección pronuclear de ADN para crear animales transgénicos está bien descrita (p. ej. véase, K. Becker & B. Jerchow "Generation of Transgenic Mice by Pronuclear Microinjection" pág. 99-115 en "Advanced Protocols for Animal Transgenesis. An ISTT Manual. Ed. Shirley Pease & Thomas L. Saunders.Springer Protocols 2011). Brevemente, se aíslan ovocitos fertilizados de ratones hembra superovulados que se han apareado con un macho semental. Para dar superovulación, se inyecta a hembras por vía intraperitoneal el día -2, 100 ul de PBS que contiene 5 UI de gonagotropina sérica de yegua preñada (PMSG). Después de 46-48 horas, se administran 5 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG) en 100 ul de PBS (i.p.) y las hembras se aparean con los machos sementales. A la mañana siguiente, se recogen los complejos de cúmulos de los oviductos recogidos y se liberan los ovocitos por digestión con solución de hialuronidasa. Se pueden usar satisfactoriamente varias cepas de ratones para producir los ovocitos fertilizados para microinyección.

Usando ratones C57Bl6 x CBA F2 de tipo natural (wt), se adoptó el procedimiento anterior para introducir ADN de YAC purificado. Como se ha indicado en el resumen de transgénesis (fig. 13), se adopta un procedimiento similar cuando se usan ratones TKO. Con el fin de facilitar su purificación para la microinyección, los YAC se transformaron en las levaduras de la cepa llamada "window" (Hamer et al., PNAS, 1995, 92 (25), 11706-10). Las levaduras de la cepa "window" son una serie de levaduras hospedantes creadas con divisiones estratégicas de cromosomas endógenos de modo que, cuando se someten a electroforesis en gel, el YAC pasajero migra a un tamaño que carece de cromosomas endógenos de levadura. Alternativamente, se creó una cepa "window" adecuada nueva usando los cebadores adecuados y la estrategia de PCR para dividir un cromosoma de levadura. Por lo tanto, el YAC para microinyección se purificó usando electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), seguido de un segundo procedimiento de elución por electroforesis en gel. Este procedimiento lo describen A. Fernandez, D. Munoz y L. Montoliu en "Generation of Transgenic Animals by Use of YACs" pág 137-158 en "Advanced Protocols for Animal Transgenesis. An ISTT Manual. Ed. Shirley Pease & Thomas L. Saunders.Springer Protocols 2011. Después de recoger los ovocitos fertilizados, la solución de ADN de YAC purificado se inyectó en el pronúcleo usando agujas de microinyección de cristal estirado. Todo el trabajo se llevó a cabo usando micromanipuladores bajo un microscopio que llevaba una platina calentada y montado en una mesa de aislamiento de vibraciones. Después de la microinyección, los ovocitos se dejaron recuperar hasta 24 horas y luego se transfirieron a los oviductos de madres sustitutas seudopreñadas. Las hembras seudopreñadas se produjeron al aparear hembras con machos sementales vasectomizados 24 horas antes de la fecha de transferencia. Las crías normalmente nacían 19-21 días después. Debido a su tamaño, la microinyección de YAC es un proceso exigente y la eficacia de la inserción es menor que la observada con BAC o plásmidos más pequeños. La tabla 2 resume el análisis estadístico derivado de los proyectos de microinyección que se llevaron a cabo con 2 construcciones de YAC relacionadas.

TABLA 2. Transgénesis por microinyección pronuclear de YAC purificado

YAC	nº Exp.	nº ovocitos inyectados	nº ovocitos transferidos	nº crías nacidas	nº crías analizadas	nº ratones transgénicos		% ratones transgénicos
YAC 1	10	834	562	69	59	5		8,5%
						4 parcial	1 intacto	1,7%
YAC 2	7	674	474	123	122	13		10,7%
						12 parcial	1 intacto	0,8%

b. Células ES

Hay varias rutas para introducir las construcciones de YAC en células ES (descritas a continuación). Independientemente de la ruta elegida, el objetivo es obtener clones de ES que hayan integrado satisfactoriamente el transgén. La ventaja de la transgénesis mediada por ES frente a la técnica de microinyección pronuclear es que los clones de ES se pueden caracterizar completamente antes de su uso para la creación de una línea transgénica. Las caracterizaciones que se llevan a cabo en los clones de ES son esencialmente las mismas que las usadas para cribar animales F0 y F1 derivados de inyección pronuclear (ver más adelante). La hibridación in situ también se puede aplicar para determinar el cromosoma de integración. Esto puede ser particularmente deseable si las células ES son wt en lugar de TKO; solo se seleccionarían los clones de ES que tienen el YAC integrado en un cromosoma que carece de un locus de inmunoglobulina de ratón endógeno para la creación de una línea transgénica. Esta preselección garantizaría que no existieran locus conectados que pudieran impedir un retrocruzamiento eficaz al contexto de TKO.

En el futuro, el desarrollo de procedimientos que apoyan la diferenciación in vitro de células ES al linaje de células B puede permitir el ensayo funcional del locus transgénico introducido antes de la transgénesis. Sin embargo, actualmente esto no es técnicamente factible.

i) Transfección de YAC purificado

Los YAC se pueden purificar esencialmente como se ha descrito previamente (véase antes, "Preparación de YAC para microinyección"). El YAC purificado se introduce en las células ES usando, por ejemplo, lipofección (p. ej., con reactivos de lipofectamina de Invitrogen), después de lo cual las células ES se someten a selección usando higromicina (se pueden usar reactivos selectivos alternativos, según lo indique el diseño del YAC). Los clones se seleccionan y criban y se usan los clones adecuados para crear líneas transgénicas. Se pueden introducir varias características en las construcciones y/o las células ES objetivo para facilitar la derivación de clones ES transfectados (ver más adelante).

ii) Método de fusión de esferoplastos

Un método alternativo para introducir YAC en células ES es por fusión de esferoplastos. Este método proporciona la ventaja de que las manipulaciones de las construcciones grandes se minimizan limitando así la posibilidad de que se produzcan daños en la construcción por cizallamiento. La técnica de fusión de esferoplastos se ha descrito (Davies, N., et al., "Human antibody repertoires in transgenic mice: manipulation and transfer of YACs" p59-76 en "Antibody Engineering. A Practical Approach" Ed. McCafferty et al., IRL Press at Oxford University Press, 1996). Brevemente, los esferoplastos de levadura se generan por digestión con zimoliasa de la pared celular de levadura. Las células ES desagregadas se mezclan con los esferoplastos y se lleva a cabo la fusión por adición de solución de polietilenglicol. Después de la resuspensión en medio, las células ES se lavan y se someten a cultivo selectivo, clonación y cribado como se describe a continuación.

iii) Construcción dirigida de células ES Tg/TKO

Una estrategia alternativa para añadir características adicionales al transgén de YAC1 (que contiene una estructura central común a todas las construcciones de YAC posteriores) es realizar extensiones dirigidas de un transgén de YAC1 ubicado dentro de una línea de células ES (fig. 14). Las líneas de células ES que llevan el transgén YAC1 se generan in vitro o derivan de embriones de ratones transgénicos YAC1. Se pueden introducir nuevas características en el transgén por recombinación homóloga o usando vectores de inserción como se describe en otra parte en la presente memoria.

Ejemplo 4: Caracterización y cribado de fundadores.

a) Presencia de transgén y transmisión de la línea germinal.

Se comprobó en todas las crías nacidas después de transferencia de ovocitos microinyectados la presencia de YAC dentro de su ADN genómico. Para crías transgénicas derivadas de células ES, también se puede aprovechar la genética del color del pelaje en combinación con la selección de animales donantes de blastocistos adecuados para permitir que las crías quiméricas se identifiquen fácilmente por su color de pelaje. Los siguientes ejemplos de cribado usan camadas derivadas de la transgénesis por microinyección pronuclear. Sin embargo, los clones de ES se pueden someter a análisis similares antes de la transgénesis, cribándose las crías resultantes para obtener resultados confirmatorios.

El ensayo del transgén YAC implica la purificación de ADNg de biopsias de la cola o la oreja y el ensayo de regiones del YAC usando reacciones de PCR. El aislamiento del ADNg y los métodos de PCR se han descrito previamente (véase antes). Se realizaron reacciones de PCR dirigidas a zonas en cada extremo del YAC y cualquier muestra con integrantes positivos para ambas regiones después se cribó con cebadores adicionales diseñados para amplificar varias regiones internas del transgén YAC. Los cebadores de PCR usados para estos cribados se citan en la tabla 3.

Cualquier ratón fundador (F0) que daba resultados positivos de la PCR después se emparejó para comprobar la transmisión de la línea germinal del(los) transgén(es) y también para confirmar que los resultados del cribado por PCR se debían a la presencia de un YAC intacto en lugar de fragmentos; en el caso de este último, el escenario más probable era que los fragmentos se ubicaban en cromosomas diferentes y, como tales, se identificaron por su segregación independiente entre la progenie F1. Un ejemplo del cribado de un fundador y la transmisión de su línea germinal se muestra en la figura 15.

TABLA 3 Cebadores de PCR usados para cribar la presencia de transgén y transmisión de la línea germinal

Región de YAC	Cebadores	Tamaño del producto (pb)
V_H 2-5	Izquierda GAGGGAGCACCAATGAGAAG (SEQ ID NO. 45) Derecha CAGATGAGGGGAATGCAAAT (SEQ ID NO. 46)	625
V_H 4-4	Izquierda CCCAAGCTTGGTGCCTCTGATCCCAGGGCT (SEQ ID NO. 47) Derecha GCTCTAGATCTGGGCTCACACTCACCT (SEQ ID NO. 48)	380
V_H 1-3	Izquierda CCCAAGCTTGAAGCCAGTCAAGGGGGCTTC (SEQ ID NO. 49) Derecha GCTCTAGAGGGGTTTTCACACTGTGTC (SEQ ID NO. 50)	400
V_H 1-2	Izquierda CCCAAGCTTGAGTCCAGTCCAGGGAGATCT (SEQ ID NO. 51) Derecha GCTCTAGAGGGGTTTTCACACTGTGTC (SEQ ID NO. 52)	615
V_H 6-1	Izquierda CCCAAGCTTTCACAGCAGCATTCACAGA (SEQ ID NO. 53) Derecha GGAA TTCCTGACTTCCCCTCACTGTG (SEQ ID NO. 54)	336
3-63 (DP-81)	Izquierda GGGGCTGGAGGGAGTAATAG (SEQ ID NO. 55) Derecha ACTTAGCTCGGACCACAGGA (SEQ ID NO. 56)	603
3-64 (YAC6	Izquierda ATGATGGAGTTTGGGCTGAG (SEQ ID NO. 57) Derecha GGAAATCAGCCTTCATCTGC (SEQ ID NO. 58)	597
3-65 (YAC4)	Izquierda GGGTACTGCCTTCTCGTCAG (SEQ ID NO. 59) Derecha ATTTGCAGATAGGCGATGCT (SEQ ID NO. 60)	600
1-67 (YAC8)	Izquierda CCACGCTGGTCAGTTTTGTA (SEQ ID NO. 61) Derecha GCTGGGAATAGGGGACTCTC (SEQ ID NO. 62)	403
1-69 (YAC7)	Izquierda GGGGTGAGACACCTGAAGAA (SEQ ID NO. 63) Derecha GAGTGCAGGAAAATCATCCA (SEQ ID NO. 64)	406
2-70 (YAC3)	Izquierda GCACAGGTTTGTGGCATTTA (SEQ ID NO. 65) Derecha TGCAGCGGTAGGTTTTCTTT (SEQ ID NO. 66)	298
V3-7	Izquierda GCCCTTCACAGAGTCCACAT (SEQ ID NO. 67) Derecha ACTCCAAGGCCTTTCCACTT (SEQ ID NO. 68)	409
3-72 (DP-29)	Izquierda ATCTCTTCCCCTGCACTTCC (SEQ ID NO. 69) Derecha CTACCAAACGACCCAGCAAT (SEQ ID NO. 70)	395
3-73 (YAC9)	Izquierda CCATCCTCAGCAACATCTGA (SEQ ID NO. 71) Derecha GCATGAAAGGTCCTGCTACC (SEQ ID NO. 72)	405

Región de YAC	Cebadores	Tamaño del producto (pb)
3-76 (DP-41)	Izquierda GGGTGGAGAGACCAGTGTGT (SEQ ID NO. 73) Derecha TTAGGTGCTGGGAGCTCATT (SEQ ID NO. 74)	386
5-78 (DP-80	Izquierda AGGACCATGGACAAGAGTGC (SEQ ID NO. 75) Derecha TTGGAAGGATGGGCTGTATC (SEQ ID NO. 76)	608
7-81 (YAC10)	Izquierda GGGAGAATCCCCTAGAGCAC (SEQ ID NO. 77) Derecha GTGGATGTCGATGCAAAATG (SEQ ID NO. 78)	596
V1-8	Izquierda AGCTCCATGTAGGCTGTGCT (SEQ ID NO. 79) Derecha ATGGACTGGACCTGGAGGAT (SEQ ID NO. 80)	391
V3-9	Izquierda GGAGTTCTTGGCGTTGTCTC (SEQ ID NO. 81) Derecha AGGACTCACCATGGAGTTGG (SEQ ID NO. 82)	392
V3-11	Izquierda CTCAGGCTGTTCATTTGCAG (SEQ ID NO. 83) Derecha GAGCTGGGTTTTCCTTGTTG (SEQ ID NO. 84)	400
V3-13	Izquierda GGCATTTTCTCTGGAGATGG (SEQ ID NO. 85) Derecha AGGACTCACCATGGAGTTGG (SEQ ID NO. 86)	392
D1-1	Izquierda GAGTCATCAGGGTCGGTGTC (SEQ ID NO. 87) Derecha ACGACCACCGTGAGAAAAAC (SEQ ID NO. 88)	403
D 2-8	Izquierda GCTGGTGGGTGTGATGTATG (SEQ ID NO. 89) Derecha CTTCCCTTGACCGAAGACAG (SEQ ID NO. 90)	406
D3-16	Izquierda CTGTGGTAGCCACCATACCC (SEQ ID NO. 91) Derecha TGGGTAGGGACATAGGGACA (SEQ ID NO. 92)	388
D4-23	Izquierda GCTCTTGTGCTCCTGGAGAG (SEQ ID NO. 93) Derecha AAAAGGTATCCCCACCTTGC (SEQ ID NO. 94)	401
J1P	Izquierda GGGGAGCATGG TTTTTGTAG (SEQ ID NO. 95) Derecha CTGCTGCTGGGAAAACAAGT (SEQ ID NO. 96)	400
J3	Izquierda GCAGGAGAGAGGTTGTGAGG (SEQ ID NO. 97) Derecha GCTTTCCTTCTGCCTCCTTT (SEQ ID NO. 98)	390
J6	Izquierda CCTGGTTTGTTCAGGCATCT (SEQ ID NO. 99) Derecha CGGAGACAGAAGGTCTCTGG (SEQ ID NO. 100)	398
Emu	Izquierda AGCCTTTTCAGTTTCGGTCA (SEQ ID NO. 101) Derecha CTGGTTTCCAAGAGAAAAGGA (SEQ ID NO. 102)	581
Conector 1-3'enh	Izquierda CAAGTGTACAGTCCCCGAAGCAAG (SEQ ID NO. 103) Derecha TGATACACGCAACACGCTTGTC (SEQ ID NO. 104)	1357

Región de YAC	Cebadores	Tamaño del producto (pb)
Conector 2 - 3'enh	Izquierda GAGGTACAGGGGGCTCATGGGT (SEQ ID NO. 105) Derecha CTTGGCCCGCATTTACAAGACTATC (SEQ ID NO. 106)	954
His 3	Izquierda CGTGCGTGGAGTAAAAAGGT (SEQ ID NO. 107) Derecha TGAACGCACTCTCACTACGG (SEQ ID NO. 108)	592
Trp	Izquierda GCCCAATAGAAAGAGAACAATTGACC (SEQ ID NO. 109) Derecha ACACCTCCGCTTACATCAACACC (SEQ ID NO. 110)	488

b) Análisis de huella dactilar del transgén de YAC

En todos los casos, el locus transgénico llevaba secuencia de ADN genómico humano. Por lo tanto, se puede cribar la presencia del elemento Alu de ADN humano G15N2 (Genbank X55929.1) que es un motivo repetido presente en secuencias humanas. Una región dada de ADNg humano digerido con enzimas de restricción produce un patrón de bandas característico en el análisis de transferencia Southern usando una sonda de Alu. Por lo tanto, la huella digital de Alu del YAC se compara con la obtenida del ADNg extraído de animales transgénicos para dar una indicación de la integridad estructural del transgén. Se espera que el transgén de YAC intacto proporcione una huella digital similar al YAC presente en la levadura.

La sonda Alu se prepara a partir de la secuencia clonada (Genbank X55929.1) o ADNg usando los siguientes cebadores:

Región	Cebadores	Tamaño del producto (pb)
Alu	Izquierda GGATCACGAGGTCAGGAGAT (SEQ ID NO. 111)	221
	Derecha ACGGAGTCTCGCTCTGTCG (SEQ ID NO. 112)	

Las siguientes condiciones de ciclos son;

94°C 5 min
94°C 30 s
63°C 30 s } x 35
72°C 1 min
72°C 10 min

La sonda se marca usando métodos radioactivos o no radiactivos (p. ej., se usa un kit de síntesis de sonda DIG (Roche cat. nº 11636090910) durante la etapa de PCR para añadir restos de DIG-dUTP). Después la detección quimioluminiscente de la transferencia Southern con sonda es mediada por la adición de un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con fosfatasa alcalina seguido de un sustrato adecuado (p. ej., un sustrato luminiscente CDP-Star, Sigma C0712).

c) Número de copias del transgén.

Es posible que esté presente más de una copia del YAC dentro del genoma de un ratón transgénico (o un clon de ES seleccionado). Esto puede ocurrir en diferentes sitios de integración o de una forma repetitiva en una sola ubicación cromosómica. El número de sitios de integración de segregación independiente se puede inferir a partir de los estudios del patrón de herencia genética y aplicación de la genética mendeliana. Por ejemplo, un solo sitio de integración daría como resultado un patrón de herencia de 50% entre la progenie, mientras que 2 sitios de integración darían una herencia transgénica: no transgénica 3:1.

Se usó un planteamiento basado en Q-PCR para comparar cantidades relativas de amplicones de una región del YAC con una reacción de PCR de un gen de mantenimiento. La evaluación del número de copias se llevó a cabo usando

reacciones multiplexadas donde el amplicón de referencia y el amplicón transgénico se indicaban usando colorantes independientes. Por ejemplo, se usó tecnología de sonda TaqMan (o una alternativa adecuada) que usa ensayos específicos para un gen diploide de mantenimiento (p. ej., receptor de transferrina de ratón; Invitrogen cat. nº 4458366) y una región del YAC (p. ej., la región J humana del transgén; ensayo de número de copias de Taqman id Hs03892805_cn o el gen de selección de higromicina; ensayo id Mr00661678). Para estas reacciones, la Q-PCR se configuró usando reactivos disponibles en el mercado (p. ej., Taqman Genotyping Master Mix 400rxns, cat. nº 4371355) usando condiciones basadas en las recomendadas por el fabricante y los valores de CT para cada uno de los amplicones se miden dentro de la misma reacción de PCR. Un ejemplo de un análisis de número de copias se muestra en la figura 16. En este ejemplo, se muestran los análisis de Q-PCR de ADN de ratones que son heterocigotos para YAC2 (integran una sola de copia) u homocigotos para el transgén YAC2 (2 copias).

Ejemplo 5: Reproducción a TKO

a) Reproducción convencional

Ratones transgénicos creados en un contexto de tipo natural se retrocruzaron con la línea TKO para transferir el transgén a este contexto deseado. Esto se logró por reproducción convencional, usando etapas de reproducción secuenciales con una progenie cuidadosamente genotipada que se seleccionó para cada programa de reproducción.

b) Retrocruzamiento incorporando FIV.

Llevar una línea transgénica hasta el contexto de TKO es un procedimiento prolongado en el que cada ronda de reproducción tarda 9-12 semanas en completarse. Sin embargo, se usó un procedimiento de FIV para expandir la reproducción a una escala tal que, con una programación cuidadosa, era posible completar el retrocruzamiento para dar una cohorte de tamaño considerable de crías Tg/TKO en ~15 semanas desde el apareamiento inicial del Tg/wt con la línea TKO. La tabla 5 contiene datos de dicho programa de reproducción mejorado por FIV. Se puede usar una etapa de FIV similar para expandir rápidamente líneas transgénicas que ya se producen en un contexto de TKO (p. ej., de células TKO/ES o de microinyección pronuclear a ovocitos TKO).

Se determinaron las condiciones que permitían que los ratones TKO se usaran para el suministro de grandes cantidades de ovocitos para la fertilización con esperma derivado de ratones macho donantes transgénicos. Brevemente, se trataron ratones hembra de 8-12 semanas de edad con hormonas para inducir la superovulación (véase el ejemplo 3). Los ovocitos se fertilizaron con esperma de los machos transgénicos sementales y los ovocitos fertilizados se transfirieron a hembras seudopreñadas, ya sea en el espacio de 4 - 24 horas o se crioconservaron para su posterior transferencia.

TABLA 5 Datos de reproducción por FIV de línea YAC1

nº transferido	Reciente o después de crioc.	nº receptores	nº crías	%
690	reciente	35	222	32,2%
300	crioc.	15	150	50,0%
300	crioc.	15	32	10,5%
1290		**65**	**404**	**31,3%**

Ejemplo 6: Evaluación del uso de transgén

Durante el desarrollo de las células B, se produce la recombinación somática de los locus de inmunoglobulina dando lugar al repertorio de anticuerpos (p. ej., para una revisión, véase *Kuby Immunology*, sexta edición; T.J. Kindt, R.A. Goldsby, B.A. Osborne, J Kuby. Published by W.H. Freeman and Company, New York, 2007). Para la cadena pesada, este proceso implica la recombinación de regiones V-D-J. La unión imprecisa de estos segmentos génicos se suma a la potencial diversidad disponible del repertorio naïve. Los fragmentos génicos de VDJ empalmados dan lugar al dominio V_H y este está conectado a otros dominios codificados por los genes de la región constante. El ADNg reordenado da lugar a transcritos de ARN dentro de las células B y estos se traducen para dar moléculas de HcAb tanto expresadas en la membrana como secretadas. Por lo tanto, cuando se buscaba la actividad funcional de los transcritos del transgén de YAC, se ensayaron tanto las células B como las proteínas séricas.

Las siguientes secciones describen algunos de los diversos ensayos moleculares, de proteínas y celulares que se pueden usar para determinar si un transgén introducido es funcional.

a) Análisis molecular; Transcritos - RT-PCR, clonación y secuenciación.

Se obtuvieron muestras linfoides de los animales transgénicos (p. ej., muestra de sangre, bazo). El ARN se aisló de las muestras linfoides usando reactivos disponibles en el mercado (p. ej., kit RNeasy Qiagen cat. nº 74106) y se realizó la transcripción inversa usando cebadores adecuados (detalles a continuación) o el cebador oligodT (Gibco) con enzima Supercript III (Gibco). Todos los tampones y condiciones asociados eran los recomendados por el fabricante. El ADNc así obtenido se usó en reacciones de PCR para amplificar las regiones V_H, ya sea usando cebadores específicos para los dominios V_H (algunos con adaptaciones para la generación de bibliotecas en adelante, véase a continuación) o con cebadores para los líderes de V_H y las regiones constantes (Tabla 6).

Tabla 6 Cebadores usados para el análisis de ratones transgénicos

Ratón C_H2 rev	GACCTCGGGATCATCCTTGC (SEQ ID NO. 113)
$V_H$leader1_17mer	ATGGACTGGACCTGGAG (SEQ ID NO. 114)
V_H2 leader.2	ATGGACACACTTTGCTCCACGC (SEQ ID NO. 115)
V_H4 leader	ATGAAACACCTGTGGTTCTTC (SEQ ID NO. 116)
V_H6 leader	ATGTCTGTCTCCTTCCTCATC (SEQ ID NO. 117)
V_H3-leader	ATGGARTTKGGRCTGAGCTG (SEQ ID NO. 118)
$V_H1.2_3_genomic_$ rev	GTCAGGATGTGGGTTTTC (SEQ ID NO. 119)
$V_H2.5_genomic_$ rev	GGAGGTGCCCTGGGCTGTGTC (SEQ ID NO. 120)
$V_H4.4_genomic_$ rev	GTGTCTGGGCACACACTC (SEQ ID NO. 121)
$V_H6.1_genomic_$ rev	CTCACACTGACTTCCCCTC (SEQ ID NO. 122)
V1/a	GGAACAGACCACCATGGCCCAGGTBCAGCTGGTGCAGTCTG GGGCTGAGG (SEQ ID NO. 123)
V1/B	GGAACAGACCACCATGGCCCAGGTBCAGCTGGTGCAGTCTG G (SEQ ID NO. 124)
VH1-2+	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTG CAGTCTGGGGCTGAGG (SEQ ID NO. 125)
VH1-3	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTCCAGCTCGTGC AGTCTGGGGCTGAGG (SEQ ID NO. 126)
VH1-18	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTTCAGCTGGTG CAGTCTGGAGCTGAGG (SEQ ID NO. 127)
VH1-24	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTCCAGCTGGTA CAGTCTGGGGCTGAGG (SEQ ID NO. 128)
VH2+	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGRTCACCTTGA AGGAGTCTGG (SEQ ID NO. 129)
V2/B	GGAACAGACCACCATGGCCCAGATCACCTTGAAGGAGTCTG G (SEQ ID NO. 130)

V3/B	GGAACAGACCACCATGGCCSAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG GGGGAGG (SEQ ID NO. 131)
VH3-7+	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGGTG GAGTCTGGGGGAGG (SEQ ID NO. 132)
VH3-9	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAAGTGCAGCTGGTG GAGTCTGGGGGAGG (SEQ ID NO. 133)
VH3-11 +	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTG GAGTCTGGGGGAGG (SEQ ID NO. 134)
VH3-23	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGTTG GAGTCTGGGGGAGG (SEQ ID NO. 135)
VH4-4+	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGCAG GAGTCGGG (SEQ ID NO. 136)
V4-4/B	GGAACAGACCACCATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGG G (SEQ ID NO. 137)
VH4-34	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTACAG CAGTGGGGC (SEQ ID NO. 138)
V6/B	GGAACAGACCACCATGGCCCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAG G (SEQ ID NO. 139)
VH6-1	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTACAGCTG CAGCAGTCAGG (SEQ ID NO. 140)
VH_J/F	GCTACCGCCACCCTCGAGTGARGAGACRGTGACC (SEQ ID 141)
JH	CCGTGGTGATGGTGGTGATGGCTACCGCCACCCTCGAGTGARGAGACRGTGACC (SEQ ID NO. 142)

En los ejemplos que siguen, las reacciones de PCR usaban enzimas correctoras de errores (p. ej., ADN polimerasa de alta fidelidad de Phusion, cat. nº F530S) y condiciones de ciclo de PCR de temperaturas decrecientes ("touchdown").

Ejemplo de programa de temperaturas decrecientes;

98°C 2 min
98°C 30 s
69°C 30 s reducción en 1ºC cada ciclo } x20
72°C 30 s
98°C 30 s }
50°C 30 s x15
72°C 30 s
72°C 10 min

Los productos de la PCR se purificaron y clonaron en un vector de clonación disponible en el mercado (p. ej., pJET1.2, Fermentas K1231) o se digirieron con NcoI y XhoI antes de la clonación en un vector fagémido o se incorporaron en el vector fagémido usando una estrategia de clonación basada en la PCR (véase la fig. 17 y más adelante para detalles del vector fagémido).

Los clones se secuenciaron y analizaron para determinar si estaban presentes los transcritos derivados del transgén. Ejemplos de transcritos clonados de animales transgénicos se muestran en la figura 18. La diversidad disponible del repertorio de V_H dentro de un animal transgénico también se puede estimar a partir de dicho análisis de secuencia (aunque puede producirse sesgo de, por ejemplo, los procesos de muestreo o la inclusión de una etapa en particular de amplificación por PCR). En los ejemplos mostrados en la figura 19, los V_H se clonaron a partir de un ratón transgénico individual sin tratamiento previo. Está claro que los animales transgénicos albergan diversos repertorios de células B, con pocas secuencias duplicadas encontradas, a pesar del uso de la amplificación de la cadena por polimerasa en las etapas de clonación. Una amplia variedad de longitudes de CDR3 era evidente a partir de este análisis de ratón individual. Las secuencias se compararon con las secuencias de V_H de la línea germinal y se construyó una gráfica de variabilidad. Los V_H derivados del ratón sin tratamiento previo eran en gran parte de la línea germinal, con poca variación fuera de la región CDR3. Además de la clonación y secuenciación convencionales descritos anteriormente, el repertorio de V_H se puede analizar usando, por ejemplo, la secuenciación de la siguiente generación para investigar el transcriptoma de un animal transgénico.

b) Análisis de proteínas - ELISA en suero

La técnica ELISA tipo sándwich se ha descrito previamente (véase la caracterización del ratón TKO). Usando pares de anticuerpos adecuadas para la captura y detección, se detectó la proteína codificada por el transgén en el suero de ratones transgénicos. Los reactivos usados para ELISA tipo sándwich están disponibles en el mercado. El análisis de ratones transgénicos se muestra en la figura 20, donde se usó ELISA para detectar el HcAb dentro del suero.

También se examinó la importancia del contexto de triple inactivación génica para el rendimiento de la plataforma transgénica para la producción de HCAb que usa los genes de V_H humanos. Para hacer esto, se usó ELISA para buscar la presencia de los HCAb y complejos de cadena pesada/cadena ligera en el suero de ratones con inactivación génica de genes de la cadena pesada endógenos, pero con varios contextos de inactivación génica de cadena ligera de inmunoglobulina endógena (véase la figura 33). Para el anticuerpo de captura, se usó un anticuerpo de cabra policlonal anti-IgG de ratón (H + L) con reactividad cruzada mínima para proteínas de suero humano, bovino, de caballo, de conejo y de rata (Jackson, cat. nº 415-005-166). Este anticuerpo se seleccionó porque no lograba unir directamente los anticuerpos de detección usados en el ensayo (de rata anti-Ig de ratón-Biotina, cadena ligera Kappa, clon 87.1, BD Pharmingen cat. nº 559750, de rata anti-Ig de ratón-Biotina, cadenas ligeras lambda1, lambda2 y lambda 3, clon R26-46, BD Pharmingen cat. nº 553433, y de cabra anti-IgG de ratón affini-Pure conjugado con Biotina-SP, específico del fragmento Fc-gamma, Jackson cat. nº 115-065-008). Por lo tanto, cualquier señal medida se podría atribuir a la unión del anticuerpo de detección a proteínas de la cadena pesada capturadas y no al anticuerpo de captura en el ELISA de tipo sándwich. Brevemente, para el ELISA, los anticuerpos en el suero de los ratones se capturaron mediante el anticuerpo anti-IgG de ratón recubierto. Después del lavado, se detectaron proteínas de la cadena pesada capturadas o cadenas ligeras en complejos usando un anticuerpo anti-IgG de ratón específico de la cadena pesada biotinilado o un Ab anti-cadena ligera Kappa de ratón biotinilado o un Ab anti-cadena lambda de ratón biotinilado. Los anticuerpos de detección se visualizaron usando un sustrato TMB donde la reacción colorimétrica se produjo por la unión de complejos de Neutravidina-HRP a los marcadores de biotina de los anticuerpos de detección. Como se ha mostrado previamente (véase la figura 12), un ratón TKO que carecía de un transgén no tenía anticuerpos en su suero. Sin embargo, cuando estaba presente un transgén YAC2, se podía encontrar HcAb en todos los casos, independientemente del contexto génico de cadena ligera de inmunoglobulina endógena. Si estuviera presente un locus del gen kappa endógeno en funcionamiento, se podrían detectar cadenas ligeras kappa en las cadenas pesadas capturadas, lo que indica la presencia de HcAb transgénico, complejado con cadenas ligeras kappa endógenas. De manera similar, si estuviera presente un locus lambda en funcionamiento, se podrían detectar cadenas ligeras lambda asociadas con las cadenas pesadas capturadas, lo que indica la presencia de HcAb transgénico, complejado con proteínas de cadena ligera lambda endógenas. Cuando estaban presentes tanto los locus de la cadena ligera kappa endógena como lambda endógena, se usaron preferentemente cadenas kappa, como es normal en el ratón, donde los reordenamientos lambda se evitan por la producción satisfactoria de una proteína de cadena ligera kappa. Por lo tanto, en este caso, las cadenas ligeras lambda eran más difíciles de detectar en asociación con el HCAb quimérico transgénico. Los resultados de estos ELISA demuestran la necesidad de tener un contexto de triple inactivación génica, incapaz de producir cualquier proteína de inmunoglobulina endógena, para proporcionar un ratón transgénico capaz de producir únicamente anticuerpos de solo Hc.

Ejemplo 7: Análisis celular - Citometría de flujo

La ruta de desarrollo de las células B se puede vigilar usando citometría de flujo usando varios reactivos y marcadores bien caracterizados asociados con etapas del desarrollo particulares. Por ejemplo, las células pre-B tempranas expresan c-Kit e IL7R, siendo otros marcadores como CD43, CD19, B220 adquiridos (p. ej., CD19, B220) o adquiridos

y regulados por disminución (p. ej., CD43) a medida que la célula avanza a una célula B madura positiva para Ig de superficie (véase fig. 21). Además, dentro del repertorio de células B, se pueden usar marcadores para distinguir las células B B-2 (CD23+, CD5-) de otros subconjuntos de células B, siendo el primero capaz de participar en la respuesta inmunitaria humoral adquirida (véase la figura 22).

Para el análisis de citometría de flujo, se prepararon suspensiones de células individuales a partir de tejidos linfoides (p. ej., médula ósea, bazo) y, después de bloqueo (p. ej., con fragmentos Fc (Rockland)) se tiñeron en tampón de FACS (PBS/BSA al 1%/NaN_2 al 0,01%) con anticuerpos contra marcadores de superficie o controles de isotipo. Los anticuerpos conjugados con biotina se detectaron usando un conjugado de estreptavidina adecuado (p. ej., estreptavidina PE-Cy7). Después de la tinción, las células se fijaron con una solución de formaldehído al 3,7% y se analizaron con un citómetro de flujo (p. ej., una máquina FACSCalibur o LSRII) usando los voltajes adecuados y los ajustes de compensación. Los datos se analizaron usando una variedad de paquetes de software, incluido FlowJo & WinMDI, un programa gratuito (véase la figura 21 y 22). Los reactivos para la tinción antes del análisis de citometría de flujo son bien conocidos en la técnica (p. ej., véase http://www.bd.com/uk/products/main.asp)

Ejemplo 8: inmunohistoquímica de bazos

Los bazos tienen una arquitectura organizada con zonas de pulpa roja y blanca, conteniendo estas últimas zonas ricas en células B y células T. Se usó tinción con hematoxilina y eosina de secciones de tejido tomadas de tejidos incluidos en parafina fijados con formaldehído para revelar esta arquitectura y se muestran imágenes comparativas para ratones de tipo natural, triple KO y Tg/TKO (fig. 23). A partir de estas, es evidente que la arquitectura está comprometida en los ratones TKO teniendo los folículos menos células y una ausencia de zonas marginales alrededor de los folículos. Estas características son consistentes con la ausencia de células B en los ratones TKO. Como muestran las imágenes para ratones Tg, la arquitectura se restablece y los folículos están más densamente poblados y rodeados por una zona marginal obvia.

Ejemplo 9: Generación de dominios V_H

Se aislaron dominios V_H específicos de la diana usando bibliotecas de presentación creadas usando ARN derivado sea de ratones transgénicos inmunizados o no tratados previamente.

a) Inmunización

Se administró una selección de diferentes antígenos diana a ratones transgénicos usando uno de una serie de protocolos de inmunización que son bien conocidos en la técnica. Se muestran ejemplos de ELISA en suero en la figura 24. El ELISA de tipo sándwich es similar a los indicados antes. Brevemente, se recubrieron placas absorbentes con antígeno, y después de lavado y bloqueo, se añadieron diluciones de sueros de los animales. Se detectó cualquier unión de HCAb a las placas recubiertas con antígeno después de incubación con Ab anti-Fc biotinilado seguido de neutravidina-HRP y adición de sustrato.

b) Bibliotecas naïve

Se construyeron bibliotecas grandes para cada familia de VH usando 113 bazos de ratones transgénicos YAC1. Cada bazo se procesó individualmente y se usaron partes alícuotas de ARN individual para las diferentes construcciones de bibliotecas de la familia de VH, como se ha indicado antes. Se muestra un resumen de las propiedades de esta biblioteca en las bibliotecas naïve de la figura 35. La biblioteca consiste en aproximadamente $3,81 \times 10^{10}$ clones y una muestra de secuenciación de cada familia indica una alta diversidad clonal, aislándose la mayoría de los clones solo una vez dentro de la muestra

Construcción y uso de bibliotecas de ADNc.

Las bibliotecas de presentación se construyeron a partir de animales tanto transgénicos sin tratamiento previo como inmunizados. Brevemente, se recogieron tejidos linfoides para el ARN más tarde y después se sometieron a homogeneización mecánica y lisis. Alternativamente, se pueden usar tejidos linfoides recientes, sangre u otra fuente de células B, incluyendo hibridomas, como la fuente de ARN. Después de la extracción del ARN (ARN total o mensajero), se preparó el ADNc. Después se usó la PCR para amplificar las secuencias de V_H, añadiendo adaptadores adecuados para permitir la clonación en un vector fagémido. Se pueden usar muchas estrategias para clonar el V_H. En el presente caso, se usaron cebadores degenerados para las secuencias líder presentes dentro del transgén junto con un cebador degenerado para la unión J/H. Un método alternativo se basa en el uso de la desoxitransferasa terminal para añadir una cola de bases o anclaje de desoxinucleótido repetitivo para usar en lugar de las secuencias líderes. Tras la amplificación, los productos V_H se digirieron con NcoI y XhoI y se ligaron en el vector o se usaron como cebadores y se incorporaron en el vector fagémido usando una estrategia basada en la PCR. El vector fagémido se construyó en el laboratorio (véase la figura 17). Los cebadores con secuencias de adaptación añadidas se describen en una sección previa (véase Análisis molecular; Transcritos - RT-PCR, clonación y secuenciación).

Las bibliotecas así construidas después se usaron en las selecciones de presentación en fagos (véase el esquema del procedimiento en la fig. 25). Se pueden emplear variaciones de esta técnica, que incluyen, pero no se limitan a selecciones solubles, selecciones sesgadas por velocidad de activación o desactivación y selecciones competitivas.

El resultado de cada proceso de selección se cribó mediante ELISA y se muestran ejemplos de algunos cribados de biblioteca antes y después de la selección de fago en la figura 26. En este caso, se clonó una biblioteca de V_H a partir de un ratón inmunizado y la biblioteca se cribó por ELISA antes y después de selección en el antígeno inmunizante. Los anticuerpos para V_H específicos para el inmunógeno se identificaron por ELISA usando V_H purificado de periplasma de E. coli, siguiendo métodos publicados (*Antibody Engineering*, Editado por Benny Lo, capítulo 8, pág. 161-176, 2004). Es evidente que, ex vivo, la biblioteca contenía una baja frecuencia de aglutinantes inmunógenos. Esto está de acuerdo con la extracción de las células B, tanto de respuesta como naïve, dentro del ratón transgénico. Después de la selección de fagos, se enriquecieron los V_H de unión al antígeno (fig. 26). De hecho, como se muestra en la figura 27, era evidente la alta diversidad en la biblioteca de pre-selección y después de un ciclo de selección restrictiva mediante presentación en fagos, se encontró que los V_H de unión al antígeno pertenecen a 50 familias de secuencias, cuando se agrupan por diversidad de CDR3. Además, estaba clara la evidencia de hipermutación somática a partir de un examen de las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 y se aislaron muchas secuencias hermanas, supuestamente el resultado de la hipermutación somática in vivo dentro de los centros germinales (véase la figura 27a)i)). La hipermutación somática dio como resultado una mayor afinidad por el antígeno que se demuestra para un panel selecto de cuatro secuencias hermanas donde también se muestra la unión al antígeno (véase la figura 27a)i). Se muestra prueba adicional de hipermutación somática que conduce a la diversificación de secuencias del VH en la figura 34 - Kabat y Wu de *Antigen Binders*. En este caso, se analizaron 105 VH que se unían a uno de tres antígenos y se representó gráficamente la variación en cada posición de aminoácido, en comparación con la secuencia de la línea germinal. En comparación con la gráfica similar de un ratón sin tratamiento previo (véase la figura 19), es evidente que se han acumulado mutaciones sustanciales, siendo prevalentes las mutaciones en las regiones CDR1 y 2.

Además del aislamiento de los dominios V_H de acuerdo con técnicas conocidas y como se ha descrito antes, se analizaron los dominios V_H para determinar la afinidad por el antígeno diana (fig. 28). Esto se puede llevar a cabo mediante una serie de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a ELISA y BIAcore. Además, la unión a antígenos de la superficie celular se puede medir por separación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Además de la resistencia de la unión al antígeno diana, también se puede analizar la capacidad de un V_H para influir en la función de una diana dada (p. ej., esto incluiría la inhibición de la unión ligando:receptor). Un ejemplo de la inhibición de una interacción ligando/receptor por inclusión de VH específico para el ligando se muestra en la figura 29.

Ejemplo 10: Propiedades de V_H

Los ratones transgénicos que llevan una de las construcciones de YAC descritas antes ofrecen una ventaja significativa para el descubrimiento de candidatos a fármacos de alta calidad. A diferencia de los dominios V_H que se aíslan de fuentes convencionales (p. ej, ADNc humano), los dominios V_H se desarrollan y maduran en ausencia de una cadena ligera. Como tales, los dominios V_H derivados de los ratones transgénicos no dependen de la presencia de una cadena ligera pareja para estabilizar su plegamiento o retener su solubilidad. La evidencia de esto se obtuvo de experimentos que comparaban V_H aislado de un ratón transgénico sin tratamiento previo con los derivados in vitro de una biblioteca de ADNc humano. Se clonaron secuencias para el V_H en un vector fagémido como se ha descrito previamente y se llevaron a cabo estudios de expresión a pequeña escala (50 ml) en E. coli. Estos se realizaron sin optimización de secuencia y sin usar métodos especializados para maximizar la producción de proteínas. Después de la inducción con IPTG, se determinó la expresión de V_H soluble. Mediante el uso de V_H de familias de genes emparejadas con V, se observó que sólo 47% (15/32 clones) de los clones de V_H derivados de ADNc humano podían proporcionar al menos 10 ug de proteína soluble a partir del extracto periplásmico derivado de E. coli. En comparación, el 79% (27/34) de los V_H clonados a partir de un ratón transgénico YAC1/TKO sin tratamiento previo dio rendimientos de expresión soluble superiores a 10 µg. Además, como muestran los resultados representados en la figura 30, en una base de población, eran evidentes mayores rendimientos con V_H que se había desarrollado en ausencia de una cadena ligera dentro de un ratón transgénico (media = 176 ug/50 ml) en comparación con los que se obtienen de una biblioteca de ADNc humano (media = 37,6 ug/50 ml) que se supone que se habían desarrollado en asociación con una cadena ligera pareja. Por lo tanto, aunque V_H de cualquier fuente podría expresarse en un formato soluble, la población que se desarrolló en el ratón transgénico demostraba una mayor solubilidad dando un rendimiento general aproximadamente 5 veces mayor de proteína soluble. Eran evidentes los mejores rendimientos para los V_H de maduración por afinidad que se clonaron de ratones después de la inmunización. En este caso, los cultivos a escala de laboratorio pequeña dieron lugar a ~10 mg/litro, obteniéndose esto usando un sistema de expresión de fagémido sin ninguna optimización.

La temperatura de fusión (Tm) de una proteína se puede usar como una medida sustituta para la estabilidad de esa proteína. Después de su purificación, se usó fluorimetría diferencial de barrido (DSF) para medir la Tm de una selección de los clones de V_H anteriores. Muchos de los V_H derivados de ADNc humano no se pudieron analizar debido a sus rendimientos de producción excepcionalmente bajos y, como tal, es probable que el valor medio de Tm para esta población de clones represente el mejor de los casos. Brevemente, esta técnica se basa en la detección de fluorescencia de un colorante indicador que emite señal después de unión satisfactoria con restos hidrófobos expuestos. Por lo tanto, a medida que una proteína se calienta y se despliega, el colorante indicador puede unirse y se puede detectar la fluorescencia. Los resultados mostrados en la figura 31 se generaron usando el kit de Protein Thermal Shift (Applied Biosytems, cat. nº 4461146) y el análisis se llevó a cabo usando el software de Protein Thermal Shift (cat. nº 4466037). Se dan los valores de Tm derivados del ajuste de Boltzmann (fig. 31) y es evidente que la población de V_H aislada del ratón transgénico daba una Tm significativamente más alta en comparación con los que se aislaron a partir de ADNc humano (57,9ºC para V_H derivado de ratón transgénico en comparación con 54,1ºC para V_H clonado de fuente humana). Debe indicarse que estos datos provienen de ratones sin tratamiento previo y representan V_H que son en gran parte de secuencia de la línea germinal y no han experimentado maduración por afinidad. Después de inmunización, el V_H específico de antígeno, madurado por afinidad con frecuencia presentaba Tm significativamente elevada en comparación con los mostrados aquí.

El V_H de los ratones inmunizados no presenta una propensión a la agregación (véase la figura 32). Se llevó a cabo el análisis de HPLC por exclusión de tamaño molecular de V_H purificado. Brevemente, se analizaron soluciones de V_H usando un módulo de separación Waters 2795 en una columna G2000SWXL de gel TSK (TOSOH) con detección a 280 nm, usando una fase móvil de 10% de isoproponal, 90% de PBS o tampón de fosfato 100 mM pH 6,8, NaCl 150 mM y un caudal de 0,5 - 0,7 ml/min. Para algunas preparaciones de V_H, la cepa de E. coli particular usada permitía la ultralectura en la secuencia del gen III en el vector fagémido y es evidente una pequeña cantidad de producto de fusión V_H-gen III. Sin embargo, se encuentran cantidades insignificantes de V_H dímeros o agregados.

En general, estos experimentos demuestran que el V_H humano que se obtiene del ratón transgénico tiene mejor solubilidad y estabilidad en comparación con aquellos que se han desarrollado en asociación con una cadena ligera pareja reordenada.

Referencias

Bébin AG, Carrion C, Marquet M, Cogné N, Lecardeur S, Cogné M, Pinaud E (2010). In vivo redundant function of the 3' IgH regulatory element HS3b in the mouse. J Immunol. 184:3710-7.

Brownstein BH, Silverman GA, Little RD, Burke DT, Korsmeyer SJ, Schlessinger D, Olson MV (1989). Isolation of single-copy human genes from a library of yeast artificial chromosome clones. Science, 244:1348-51.

Chatterjee S, Ju Z, Hassan R, Volpi SA, Emelyanov AV, Birshtein BK (2011). Dynamic changes in binding of immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region to protein factors during class switching. J Biol Chem. 286:29303-12.

Cogné M, Lansford R, Bottaro A, Zhang J, Gorman J, Young F, Cheng HL, Alt FW (1994). A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. Cell. 1994 77:737-47.

Davies NP, Rosewell IR, Brüggemann M (1992). Targeted alterations in yeast artificial chromosomes for inter-species gene transfer. Nucleic Acids Res. 20:2693-8.

Garrett FE, Emelyanov AV, Sepulveda MA, Flanagan P, Volpi S, Li F, Loukinov D, Eckhardt LA, Lobanenkov W, Birshtein BK (2005). Chromatin architecture near a potential 3' end of the Igh locus involves modular regulation of histone modifications during B-Cell development and in vivo occupancy at CTCF sites. Mol Cell Biol. 25:1511-25.

Gibson DG, Benders GA, Axelrod KC, Zaveri J, Algire MA, Moodie M, Montague MG, Venter JC, Smith HO, Hutchison CA 3a. (2008). One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic Mycoplasma genitalium genome. ProcNatlAcadSciUSA. 105:20404-9.

Hamer L, Johnston M, Green ED (1995). Isolation of yeast artificial chromosomes free of endogenous yeast chromosomes: construction of alternate hosts with defined karyotypic alterations. ProcNatlAcadSci U S A. 92:11706-10.

Lieberson R, Ong J, Shi X, Eckhardt LA (1995). Immunoglobulin gene transcription ceases upon deletion of a distant enhancer. EMBO J. 14:6229-38.

Manis JP, van der Stoep N, Tian M, Ferrini R, Davidson L, Bottaro A y Alt FW (1998). Class switching in B cells lacking 3' immunoglobulin heavy chain enhancers. J. Exp. Med. 188, 1421-1431

Markie D (2006). Markers, selection, and media in yeast artificial chromosome cloning. Methods Mol Biol. 349:1-12.

Neuberger MS (1983). Expression and regulation of immunoglobulin heavy chain gene transfected into lymphoid cells. EMBO J. 2:1373-8.

Pettersson S, Cook GP, Brüggemann M, Williams GT, Neuberger MS (1990). A second B cell-specific enhancer 3' of the immunoglobulin heavy-chain locus. Nature. 344:165-8.

Sanchez CP and Lanzer M (2006). Construction of yeast artificial chromosome libraries from pathogens and nonmodel organisms. YAC protocols, 2nd. Methods in Molecular Biology. Vol 349, 13-26.

Tosato V, Waghmare SK, Bruschi CV (2005). Non-reciprocal chromosomal bridge-induced translocation (BIT) by targeted DNA integration in yeast. Chromosoma. 114(1):15-27.

Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, Truffinet V, Cogné N, Cogné M, Denizot Y (2010). Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. Blood. 116:1895-8.

Vincent-Fabert C, Truffinet V, Fiancette R, Cogné N, Cogné M, Denizot Y(2009). Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. J Immunol. 182:6926-32.

Zhang B, Alaie-Petrillo A, Kon M, Li F, Eckhardt LA (2007). Transcription of a productively rearranged Ig VDJC alpha does not require the presence of HS4 in the IgH 3' regulatory region. J Immunol. 178:6297-306.

REIVINDICACIONES

1. Un vector que comprende

a) al menos 10 genes de V de la cadena pesada humana funcionales en donde al menos 10 genes de V de la cadena pesada humana funcionales están en el mismo orden secuencial en el que se pueden encontrar en la línea germinal humana y comprenden secuencias intermedias;

b) al menos un gen de D de la cadena pesada humana y al menos un gen de J de la cadena pesada humana;

c) un potenciador µ murino

d) un elemento de cambio µ murino;

e) un gen de C murino que carece del exón de C_H1 en donde el gen de C se selecciona de Cγ1, Cy2b y/o Cy2a y

f) una región potenciadora 3' murina

en donde el vector no comprende un gen de C murino adicional.

2. Un vector de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha región potenciadora 3' murina es de al menos aproximadamente 42 kb de tamaño.

3. Un vector de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha región potenciadora 3' murina comprende uno o más o todos los elementos potenciadores seleccionados de hs3A, hs1.2, hs3B, hs4, hs5, hs6 y hs7.

4. Un vector de acuerdo con una reivindicación precedente, que comprende de 10 a aproximadamente 44 genes de V humanos funcionales.

5. Un vector de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde dicho vector es un cromosoma artificial de levadura (YAC).

6. Una célula hospedante murina transgénica transformada con un vector de acuerdo con una reivindicación precedente.

7. Una célula hospedante murina transgénica de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicha célula es una célula ES.

8. Un ratón transgénico que comprende un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una célula de acuerdo con la reivindicación 6 o 7.

9. Un ratón transgénico de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho ratón comprende uno o más locus de inmunoglobulina endógenos no funcionales.

10. Un ratón transgénico de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho ratón comprende un locus de cadena ligera lambda endógeno no funcional, un locus de cadena ligera kappa endógeno no funcional y/o un locus de cadena pesada endógeno no funcional.

11. El uso de un ratón transgénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 o una célula de acuerdo con la reivindicación 6 o 7 en la producción de HCAb o dominios V_H.

12. El uso de un ratón transgénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la construcción de una biblioteca.

13. Un método para hacer una biblioteca que comprende la inmunización ex vivo de un ratón transgénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 o tejido o células ex vivo de un ratón transgénico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10.

14. Un método para hacer un HCAb o dominio V_H que comprende introducir y expresar un vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en un ratón o en una célula hospedante murina.

15. Un método para producir un dominio de unión V_H soluble que comprende las siguientes etapas:

a) expresar un vector de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un ratón transgénico,

b) aislar una célula o tejido que expresan un HCAb,

c) clonar la secuencia que codifica el dominio V_H a partir de ARNm derivado de la célula aislada o tejido,

d) construir una biblioteca a partir de los transcritos clonados y

e) aislar el dominio V_H.

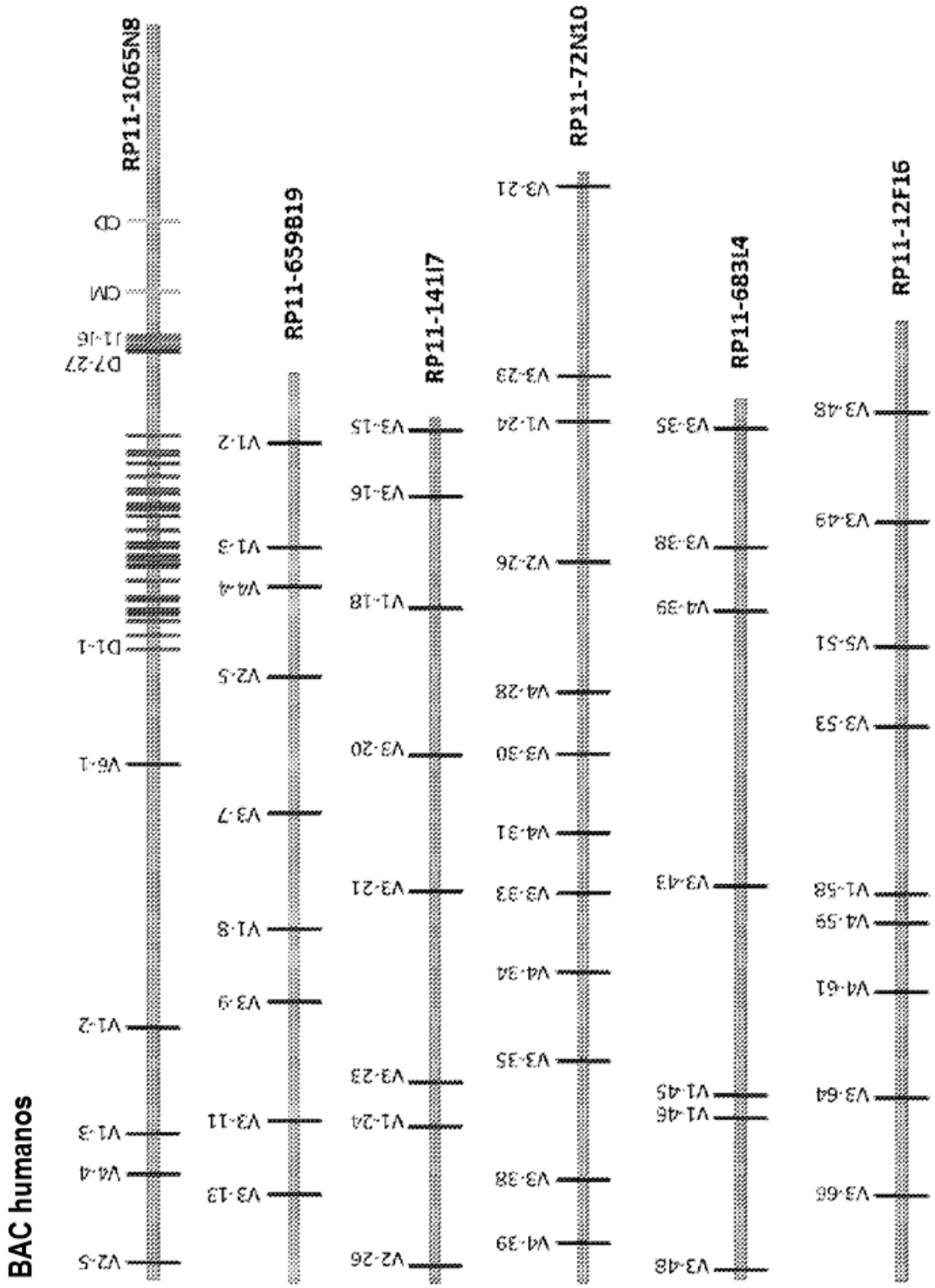

BAC humanos
RP11-1065N8
RP11-659B19
RP11-1411I7
RP11-72N10
RP11-683I4
RP11-12F16

Figura 1

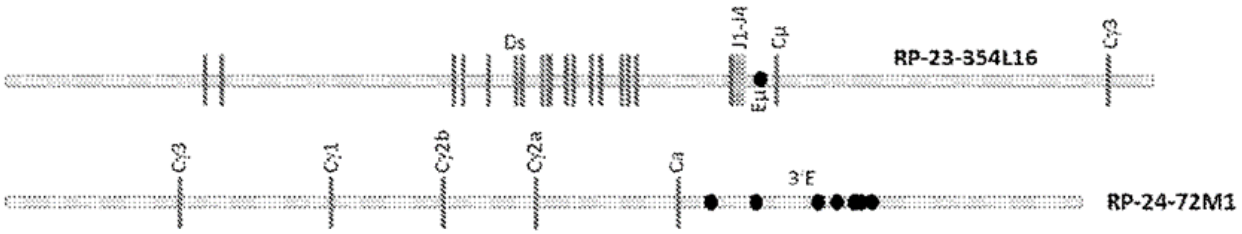


Figura 2

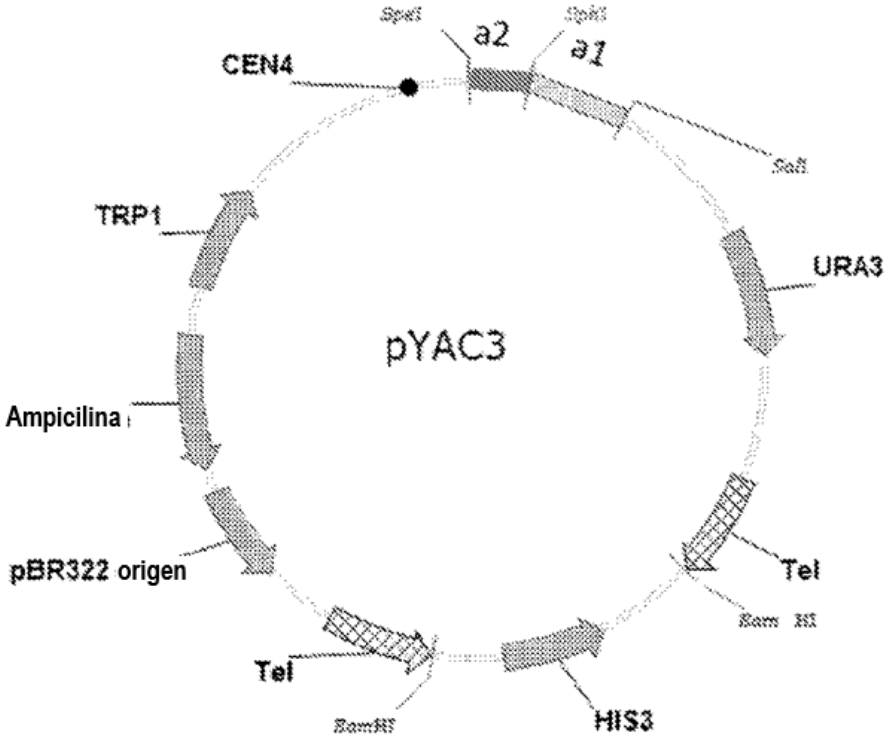


Figura 3

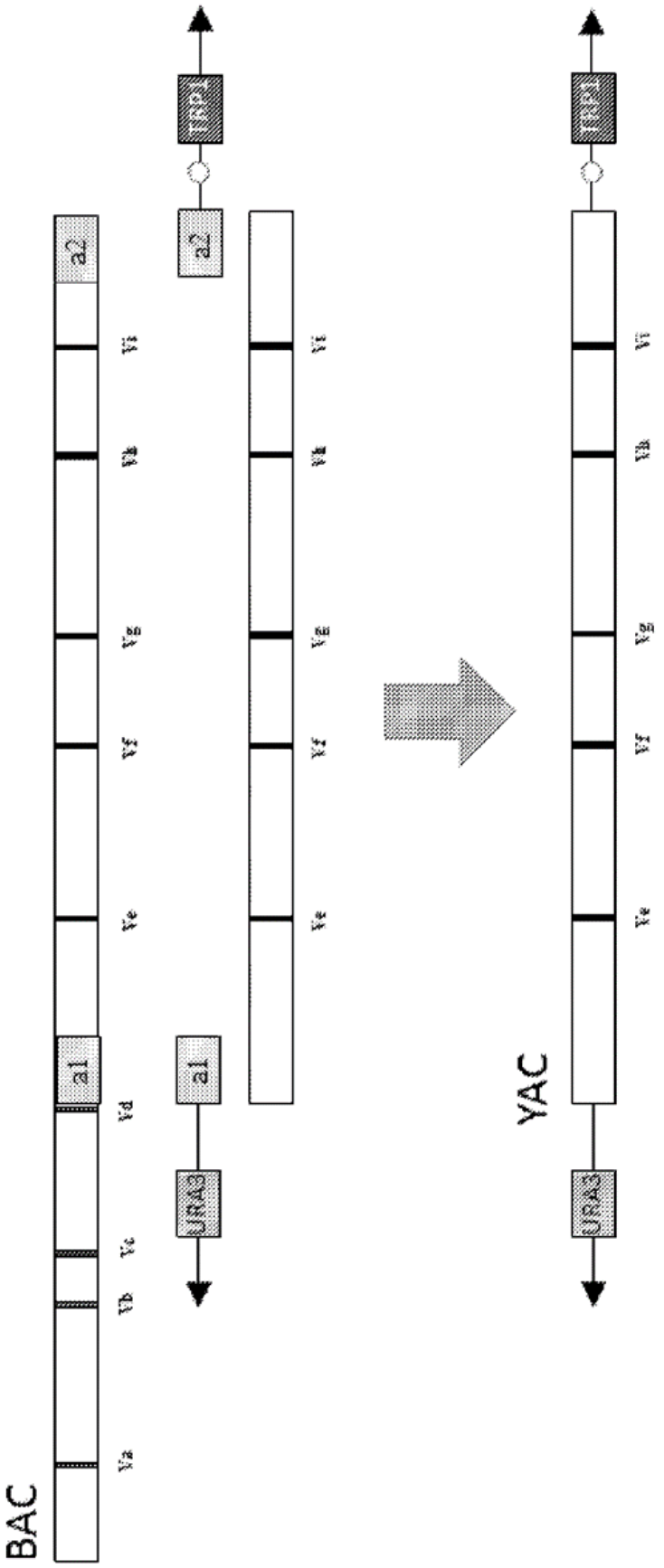


Figura 4

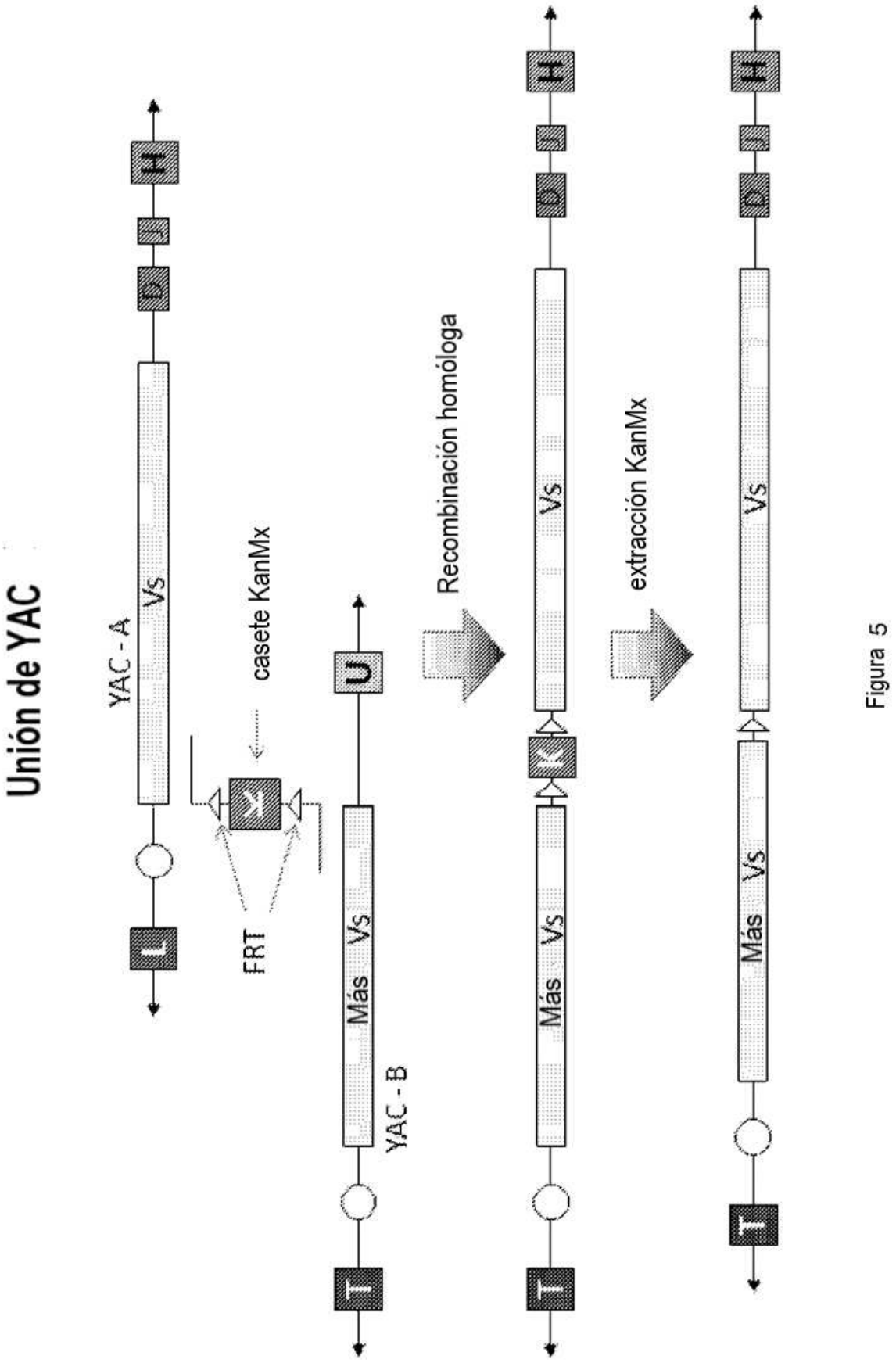

Unión de YAC
YAC - A
Vs
H
U
L
casete KanMx
K
FRT
U
Más
Vs
YAC - B
T
Recombinación homóloga
H
U
Vs
K
Más
Vs
T
extracción KanMx
H
U
Vs
Más
Vs
T

Figura 5

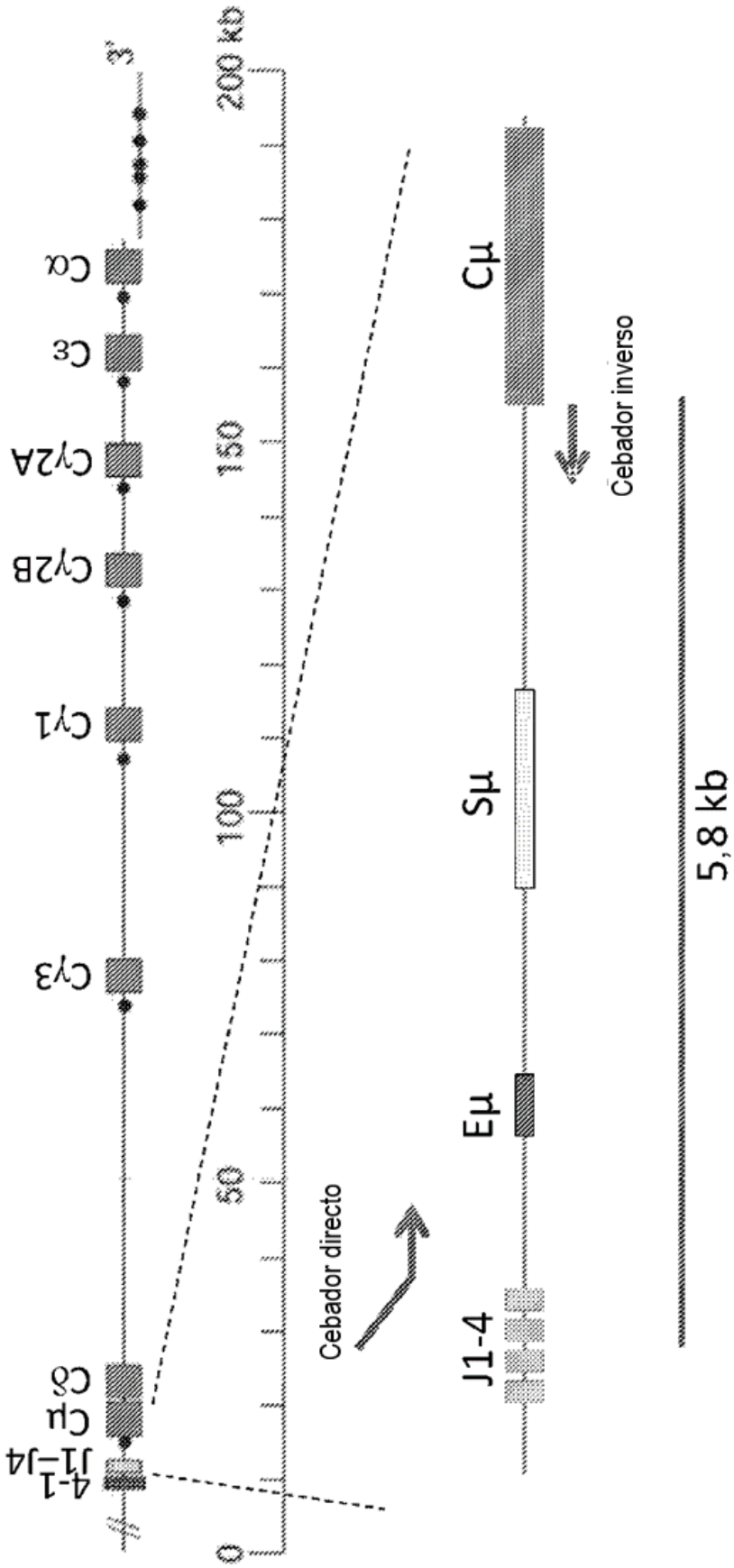

0
50
100
150
200 kb
3'
Cα
Cε
Cγ2A
Cγ2B
Cγ1
Cγ3
Cδ
Cμ
Jl–J4
4-1
Cebador directo
Cebador inverso
Cμ
Sμ
Eμ
J1-4
5,8 kb

Figura 6

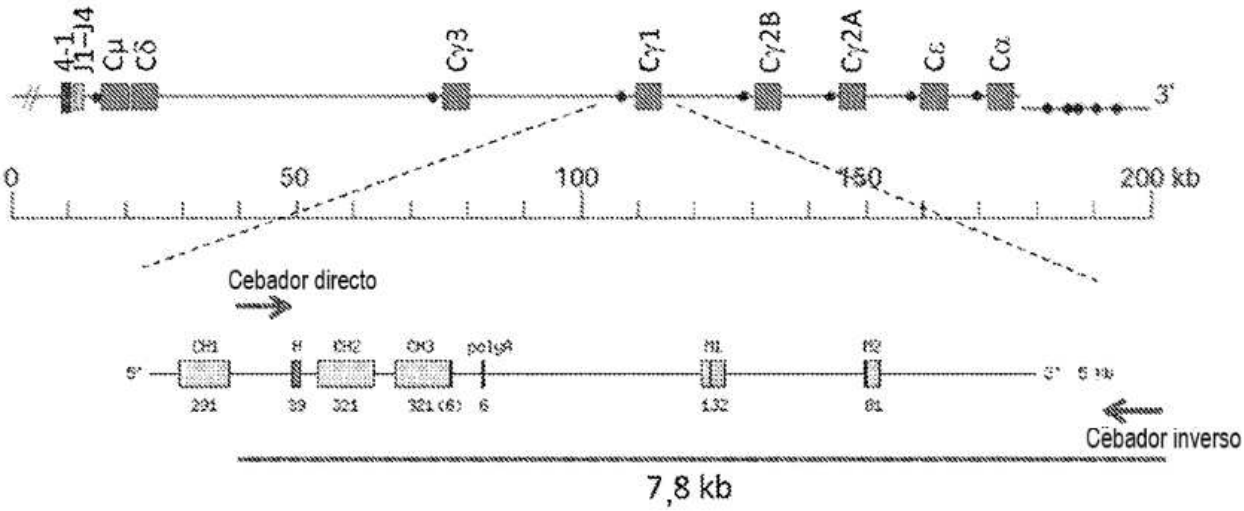


Figura 7

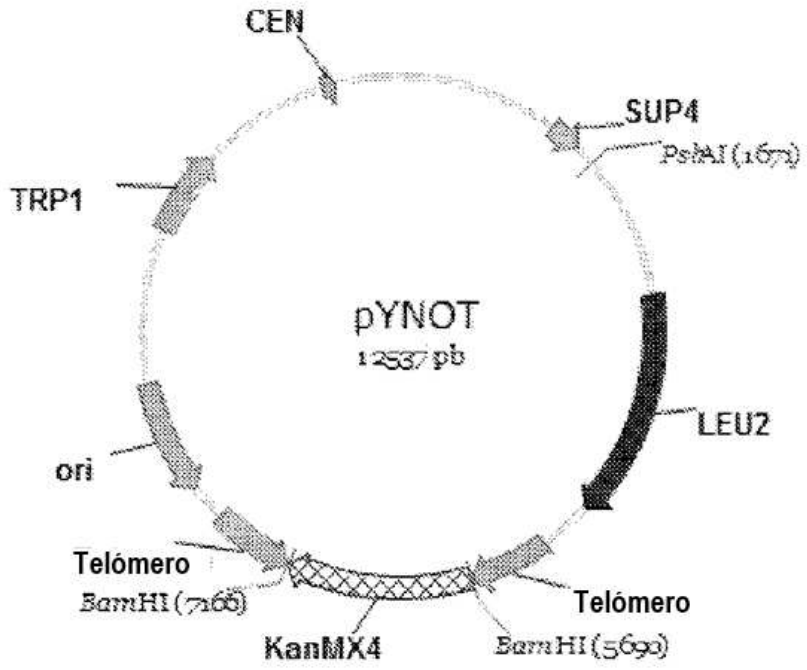


Figura 8

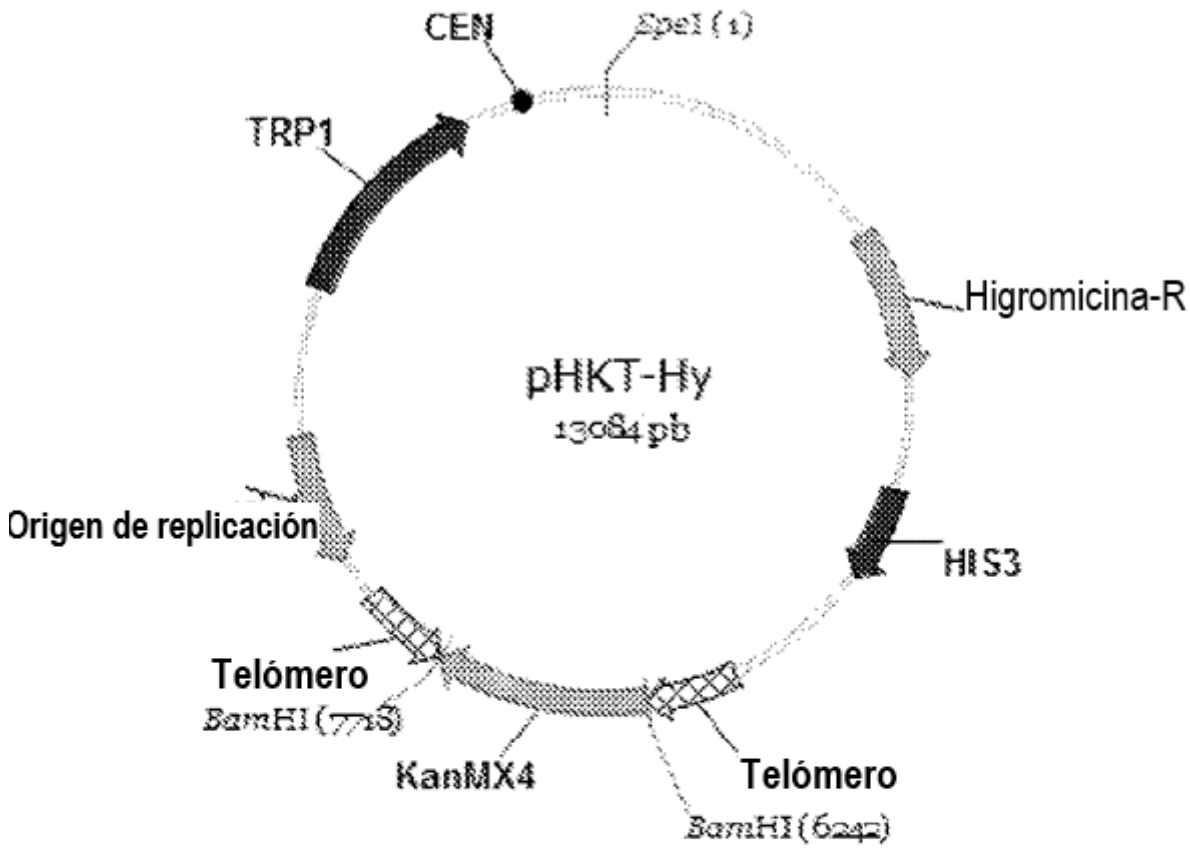

CEN
SpeI (1)
TRP1
Higromicina-R
pHKT-Hy
13084 pb
Origen de replicación
HIS3
Telómero
BamHI (7713)
KanMX4
Telómero
BamHI (6242)

Figura 9

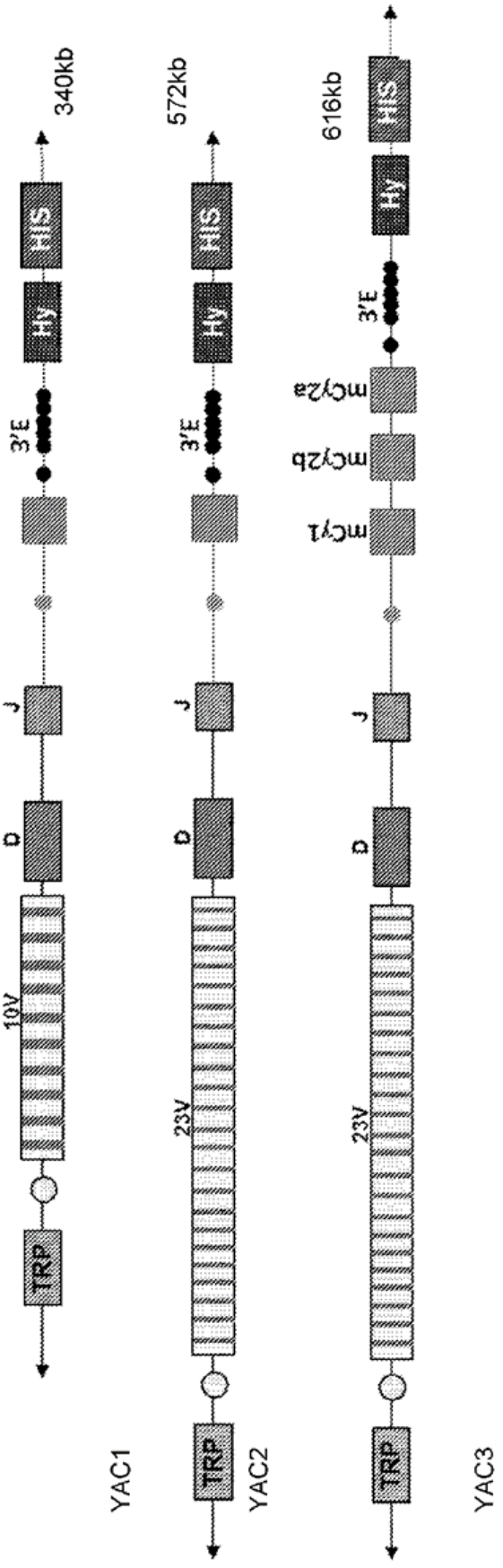

340kb
572kb
616kb
HIS
Hγ
3'E
mCγ2a
mCγ2b
mCγ1
J
D
10V
23V
TRP
YAC1
YAC2
YAC3

Figura 10

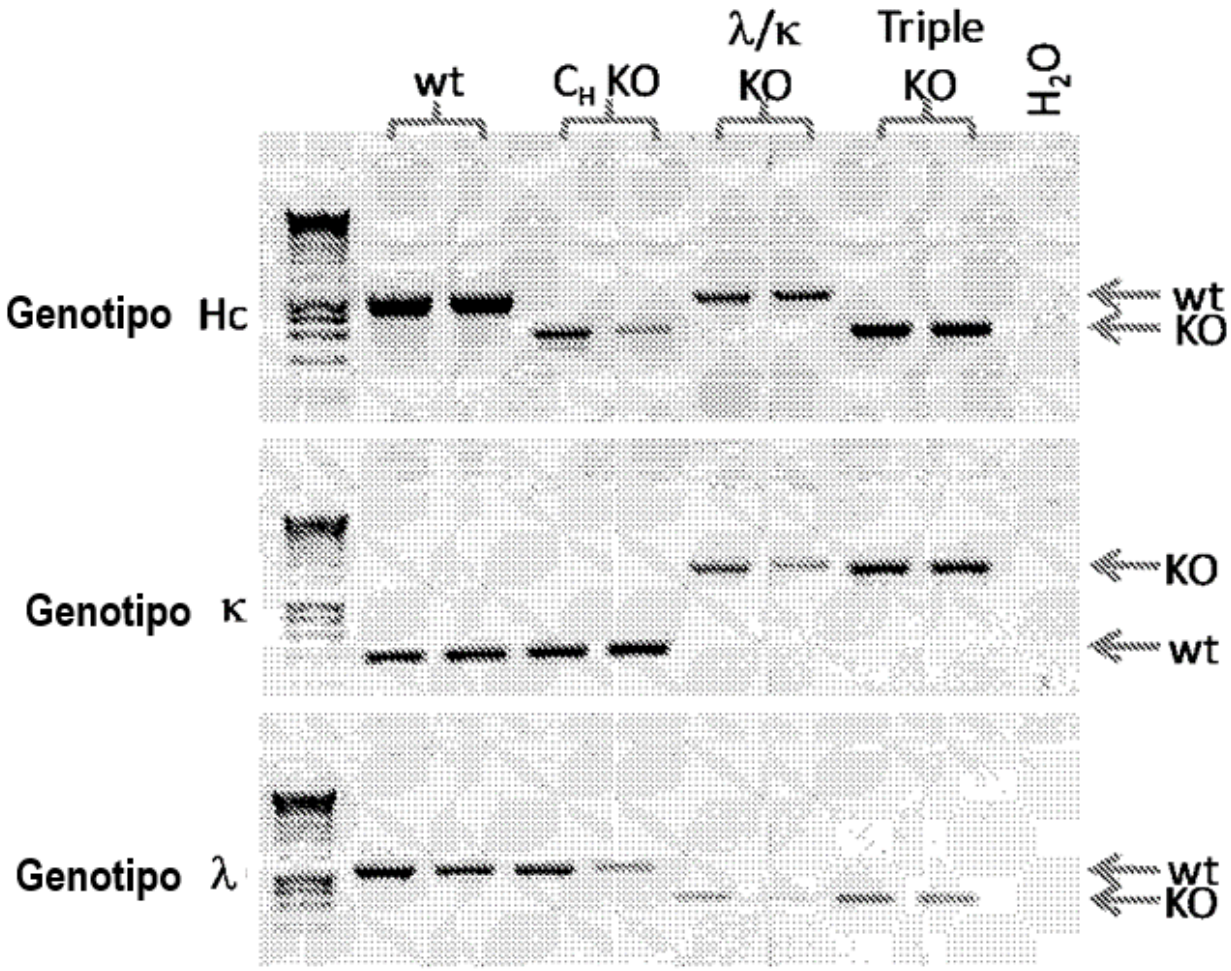
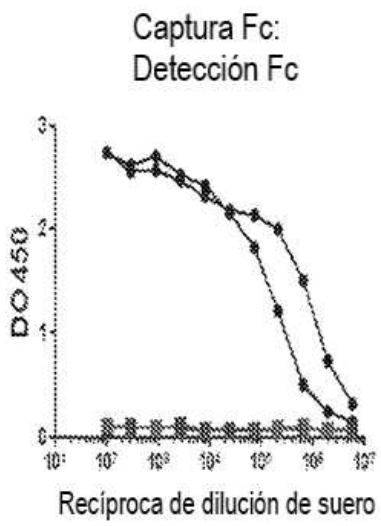

wt
C_H KO
λ/κ KO
Triple KO
H_2O
Genotipo Hc
wt
KO
Genotipo κ
KO
wt
Genotipo λ
wt
KO

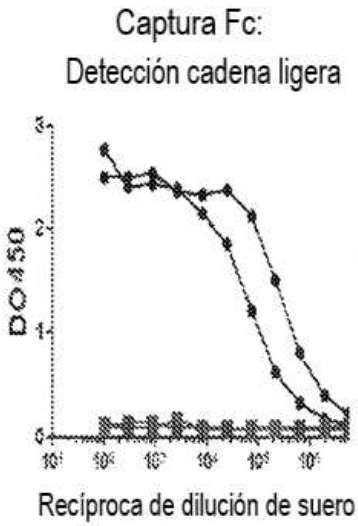
Figura 11

a



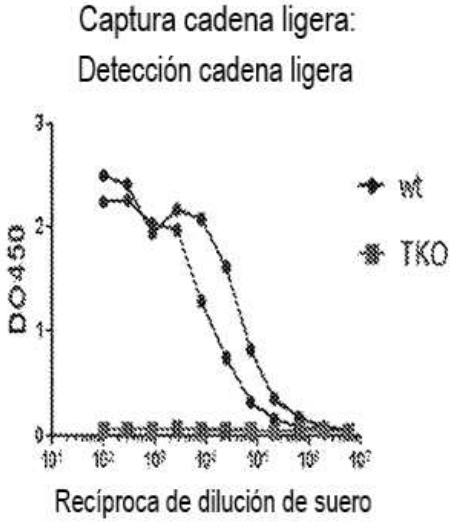
TKO no tiene cadena pesada de ratón en el suero

b



TKO no tiene complejos de cadena pesada-cadena ligera de ratón en el suero

c



TKO no tiene cadenas ligeras de ratón en el suero

Figura 12

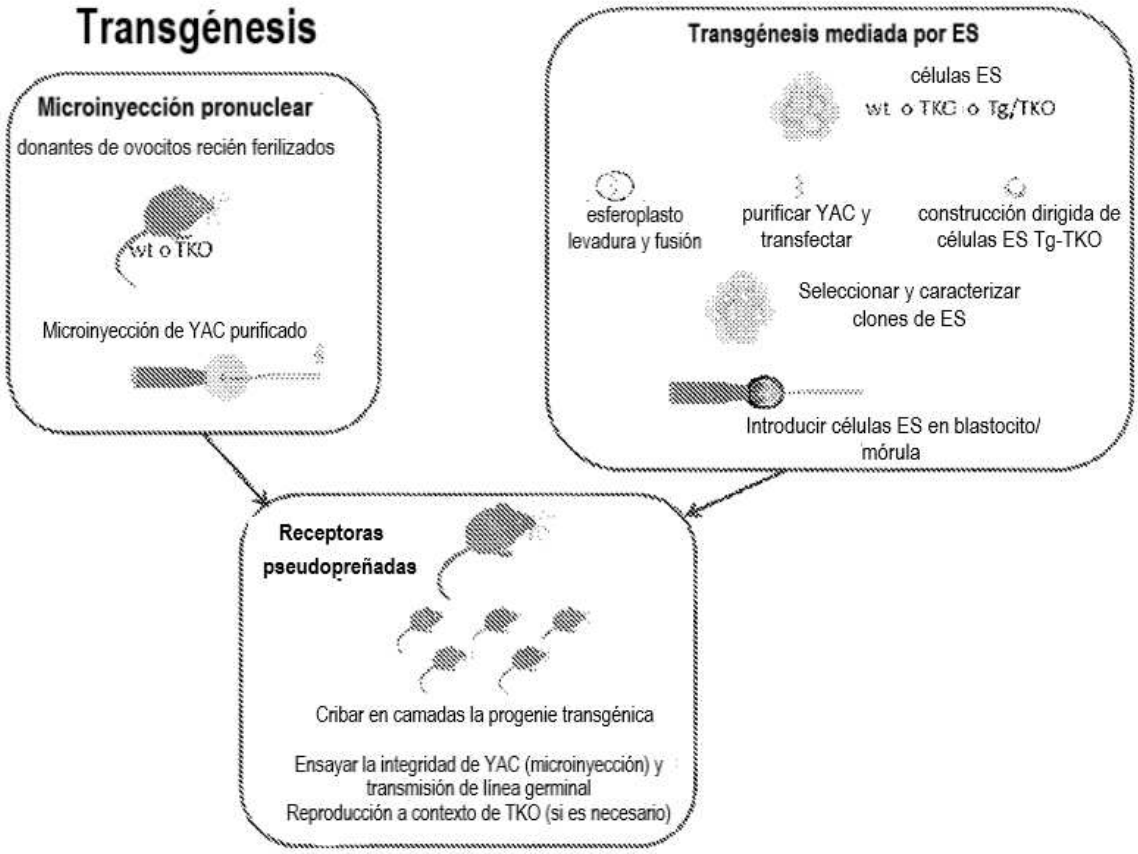


Figura 13

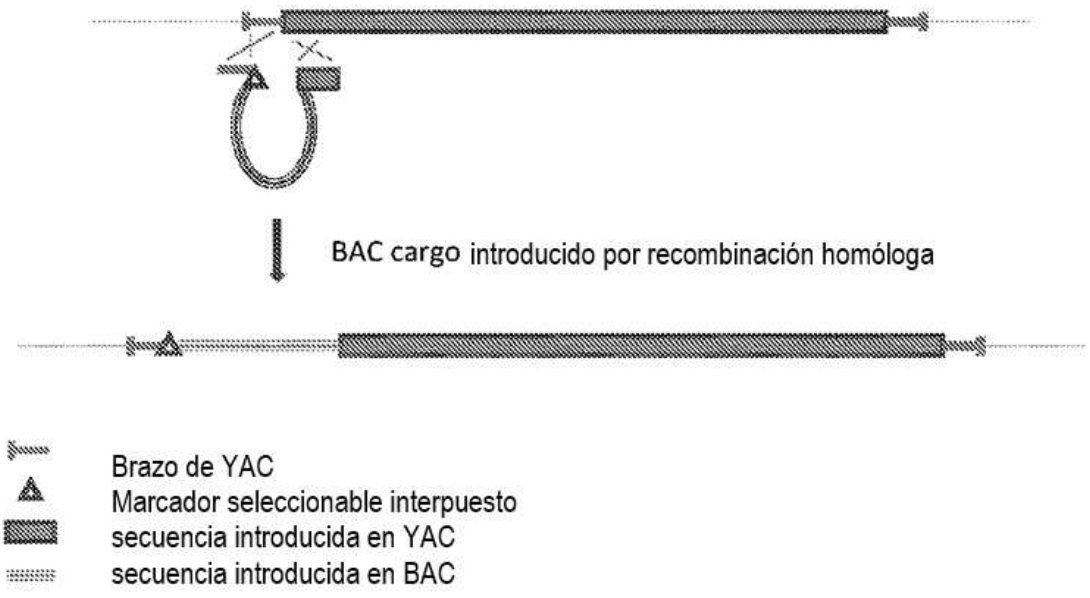
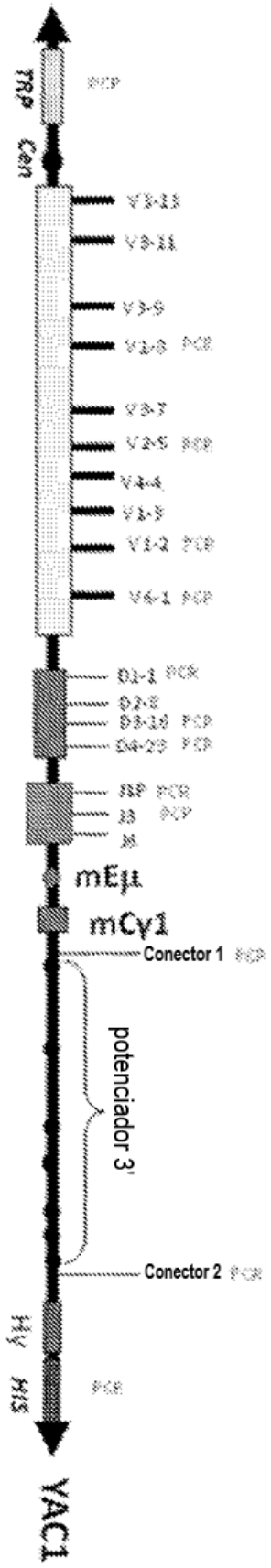


Figura 14

a


TRP
Cen
mEμ
mCγ1
Conector 1
potenciador 3'
Conector 2
Hγ
HIS
YAC1

b

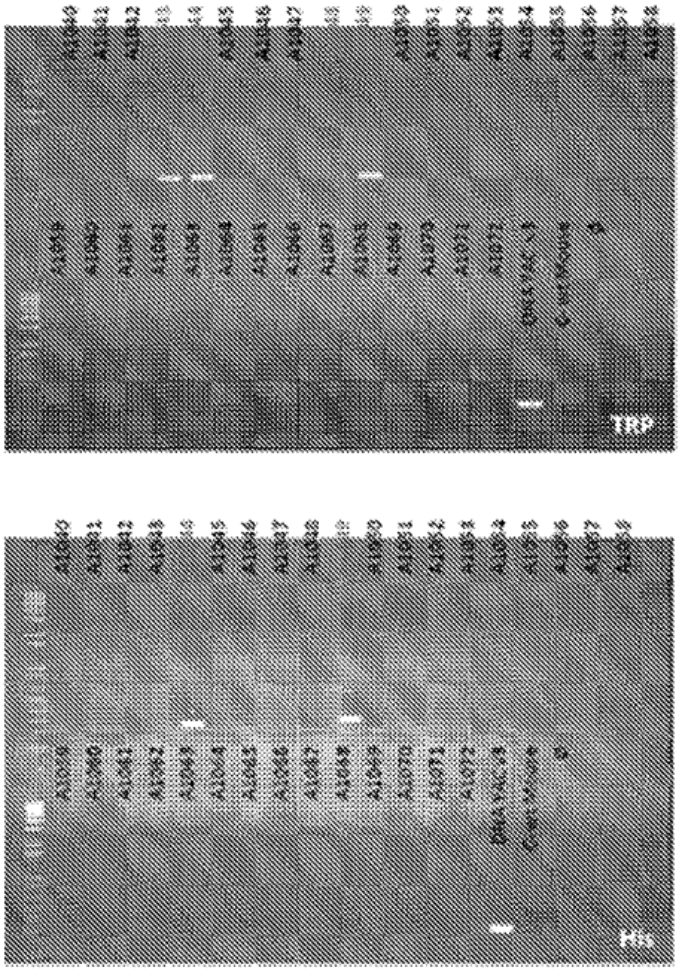
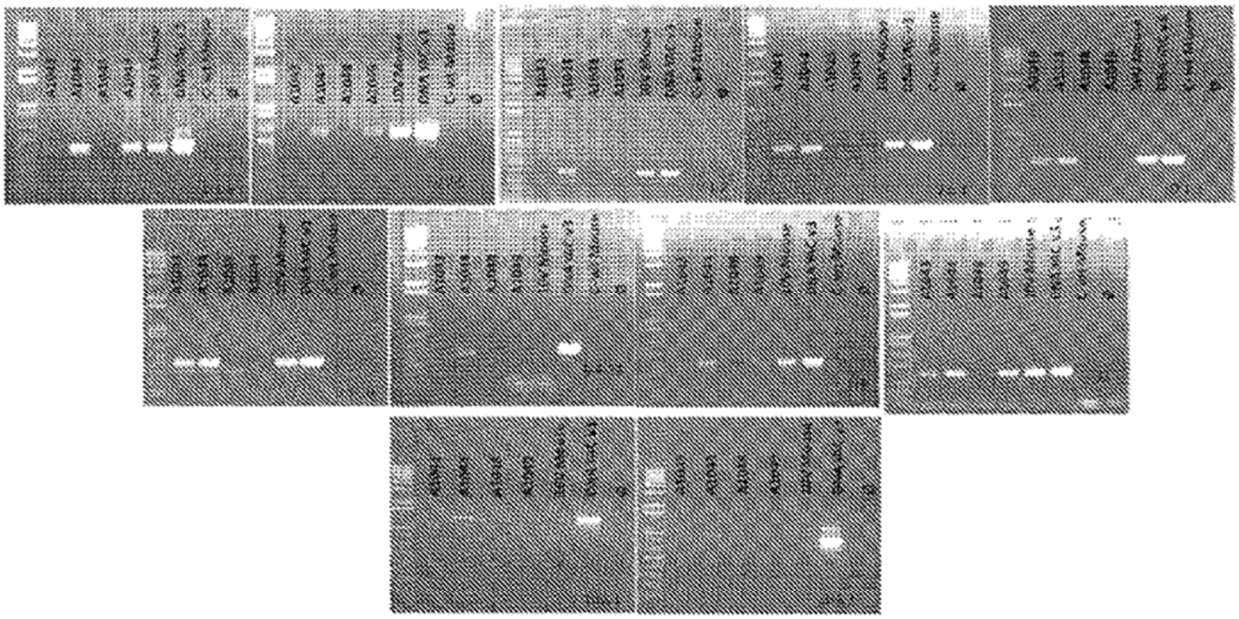

TRP
His

Figura 15



b cont.

YAC1 Ratón	Trp 1	V 3-13	V 1-8	V 2-5	V 1-2	V 6-1	D1-1	D3-16	D4-23	J1P	J3	Conector 1 PCR2	Conector 2 PCR3	His 3
A1043	✓	✓	✓	✗	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗
A1044	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
A1048	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
A1049	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✗	✗	✓
A1085	✗	✗			✗	✓	✓				✗	✗	✗	✗

PCR positiva: ✓ PCR negativa: ✗

c

Figura 15 cont.

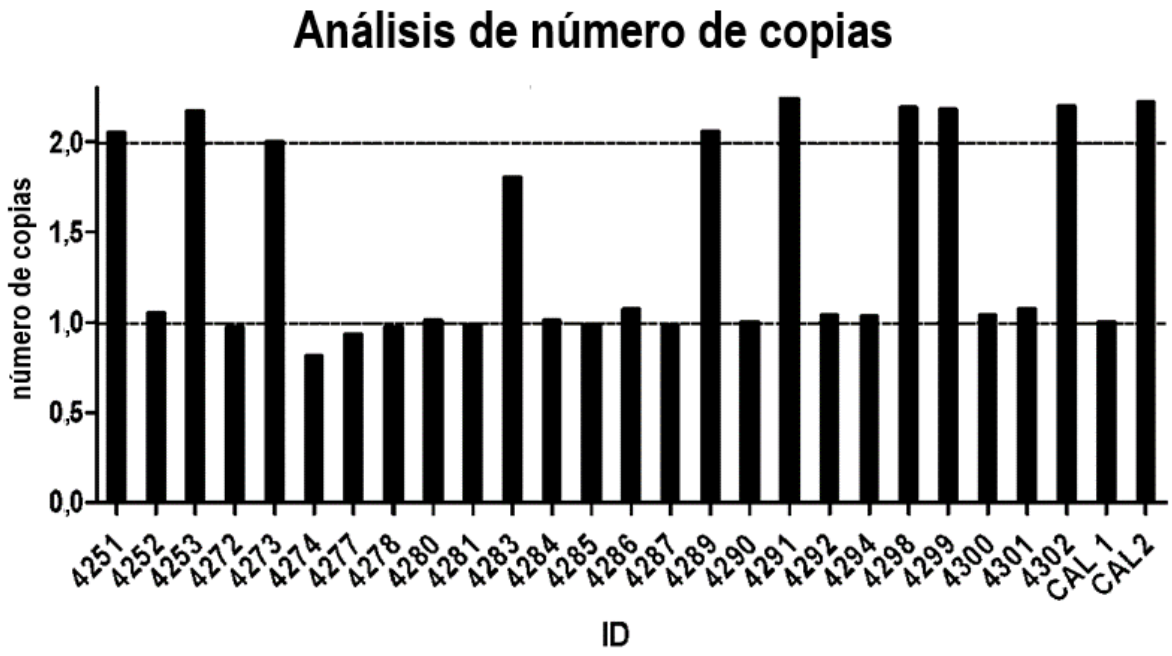


Figura 16

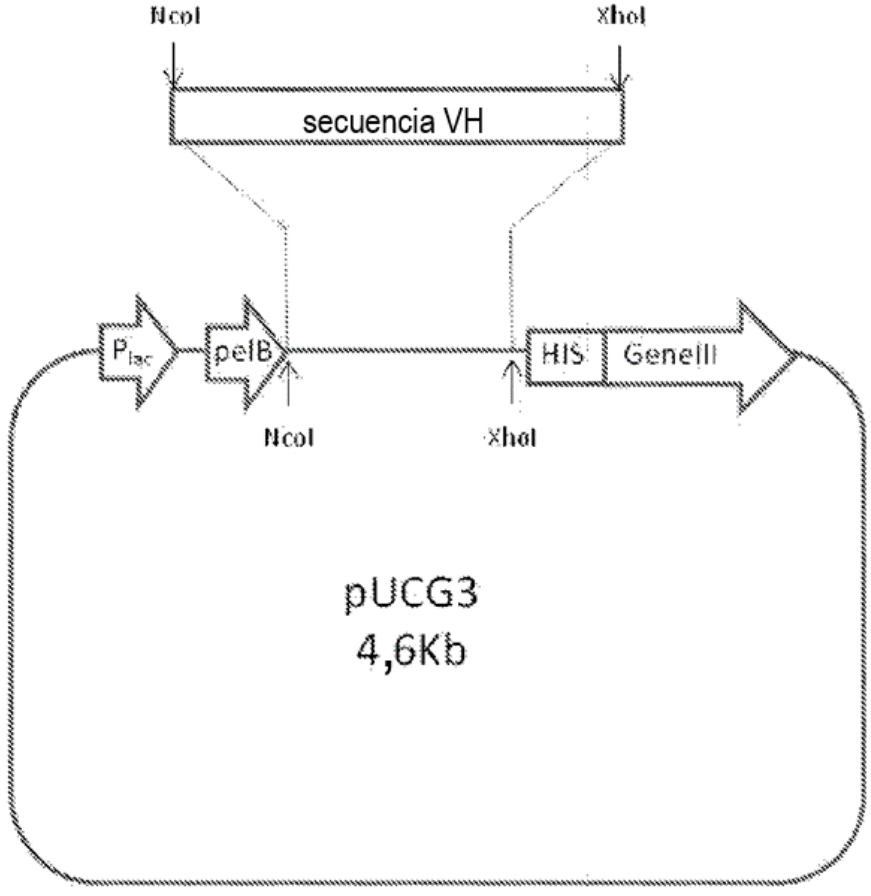


Figura 17

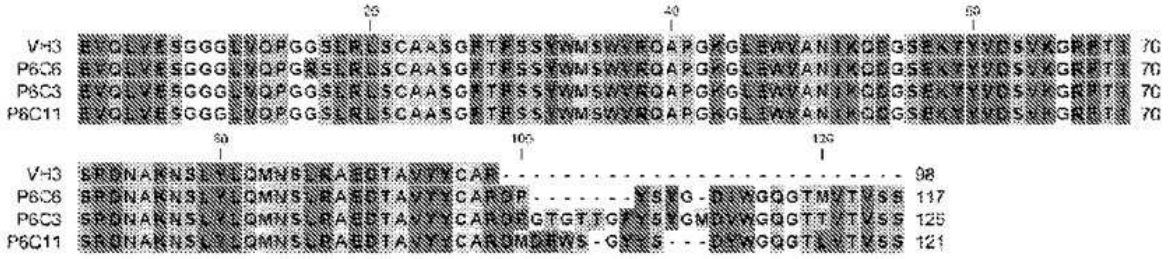
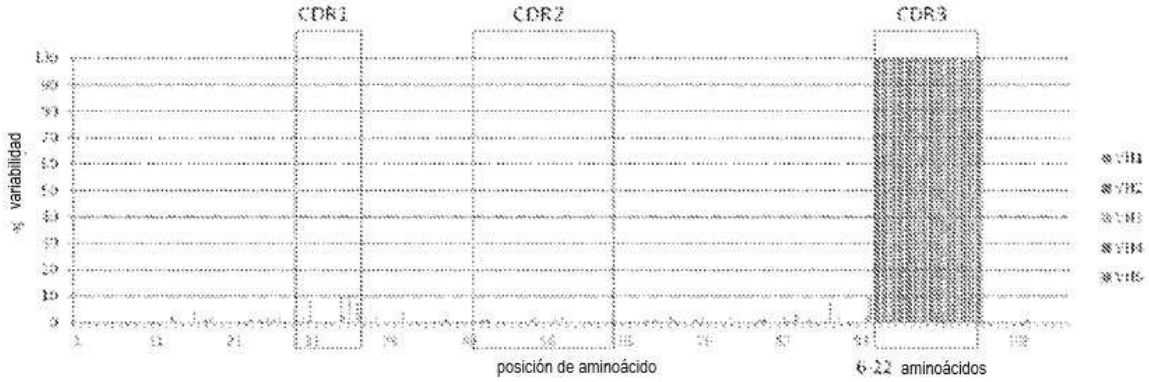


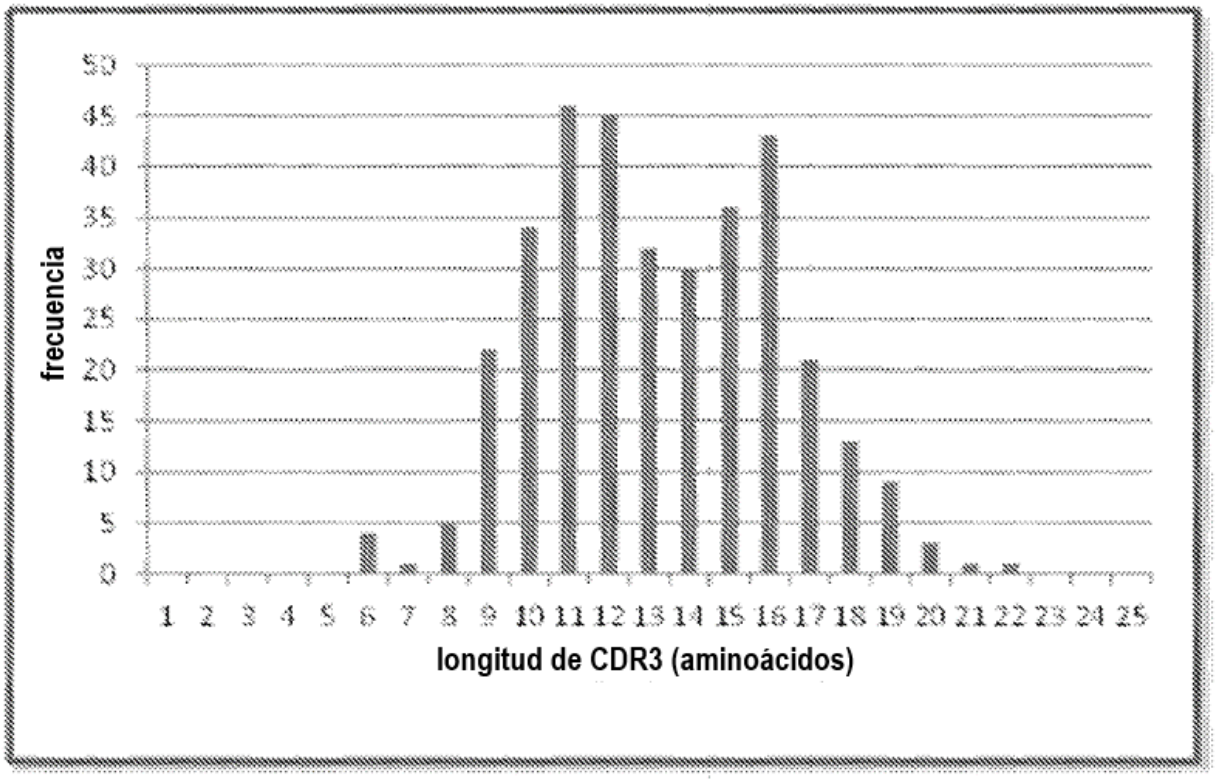
Figura 18



	VH1	VH2	VH3	VH4	VH6	Total
# de clones	69	64	77	68	57	335

a.

Figura 19



b.

Figura 19 cont.



Figura 20

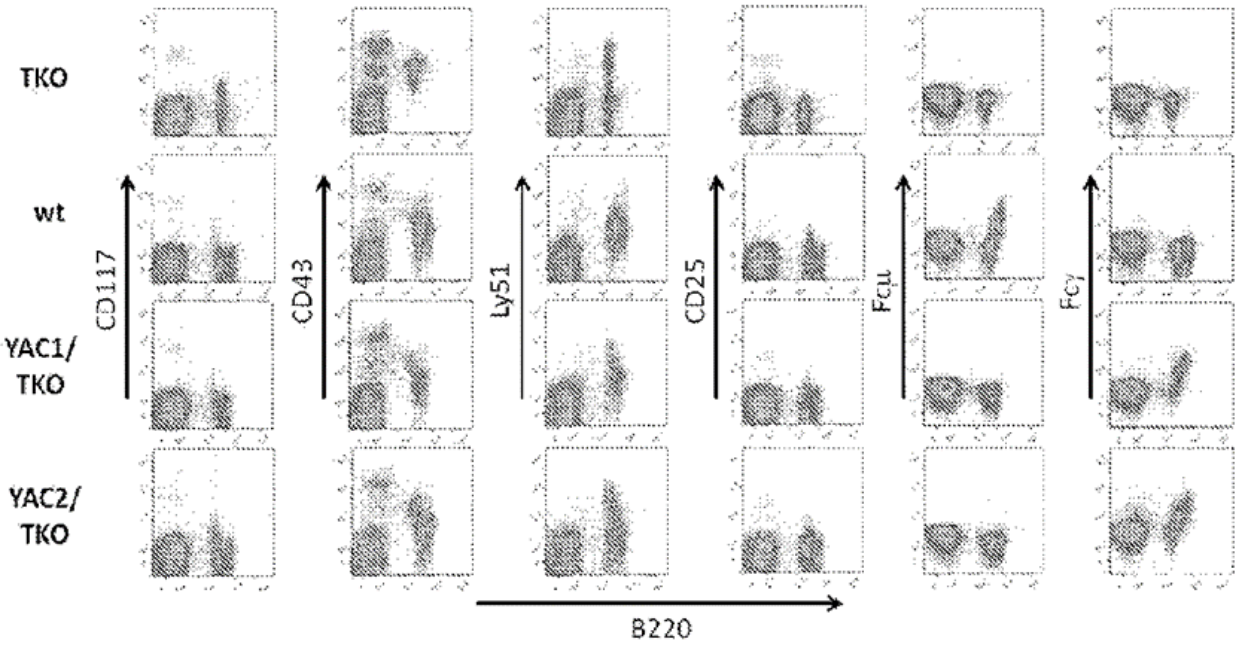
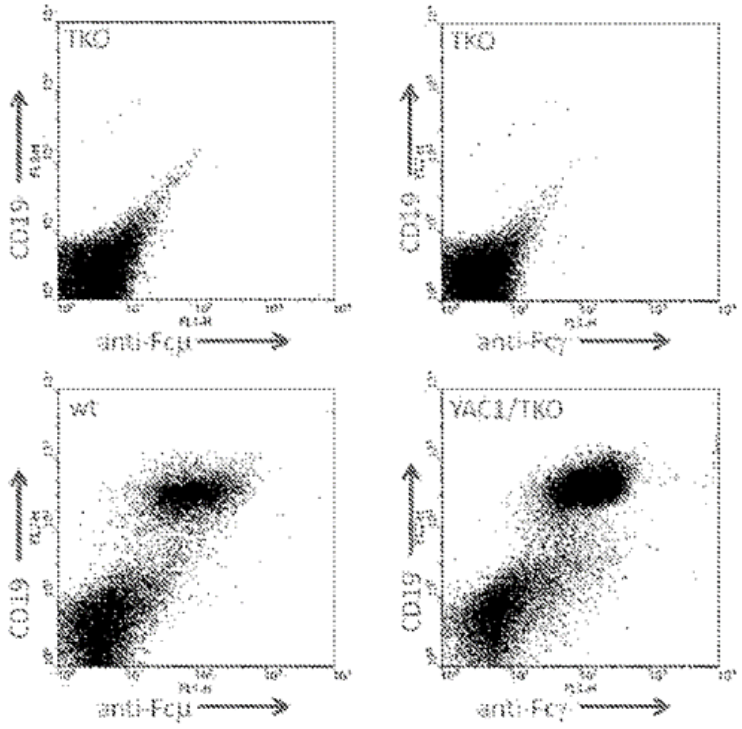
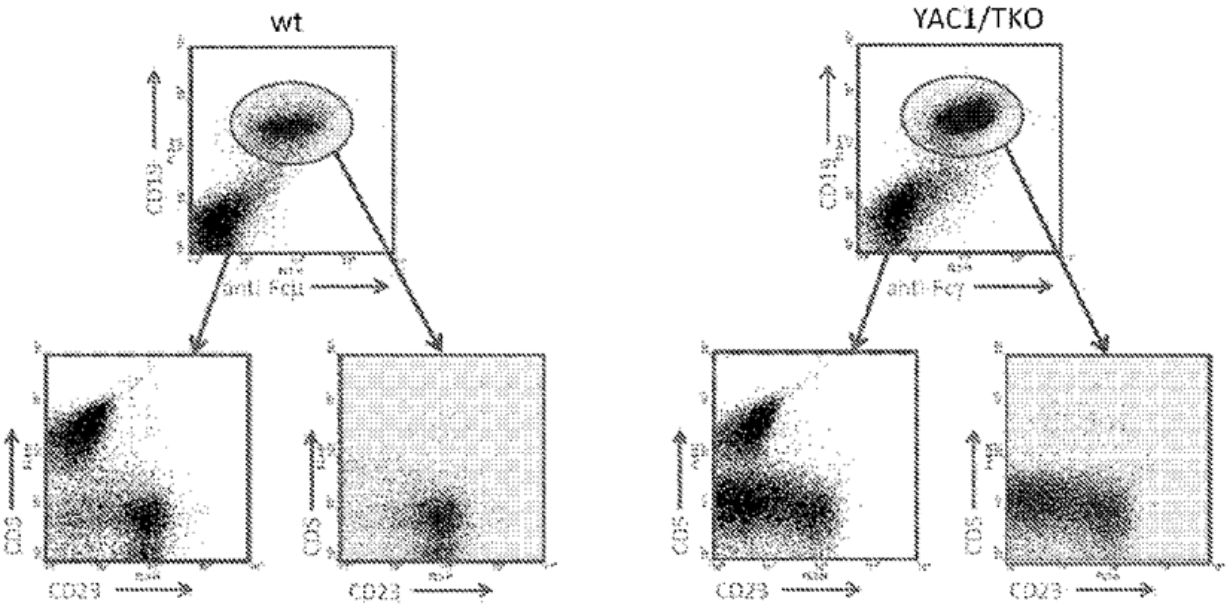


Figura 21

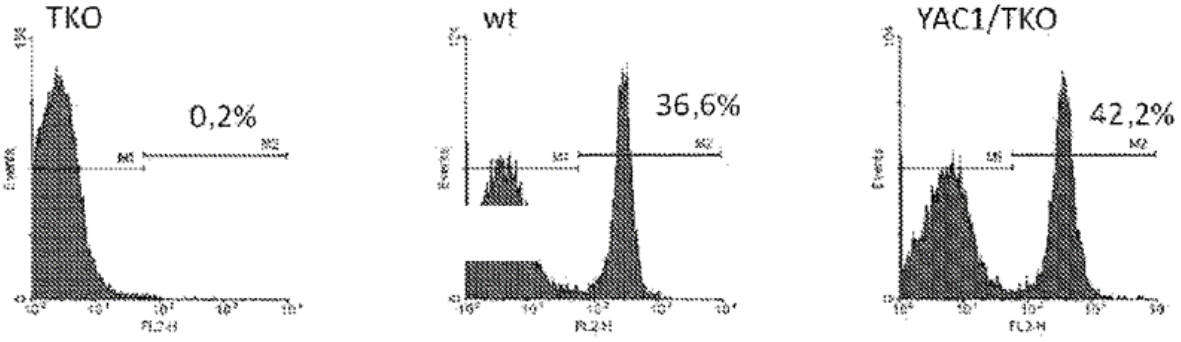


a

Figura 22



b



c.

Figura 22 cont.

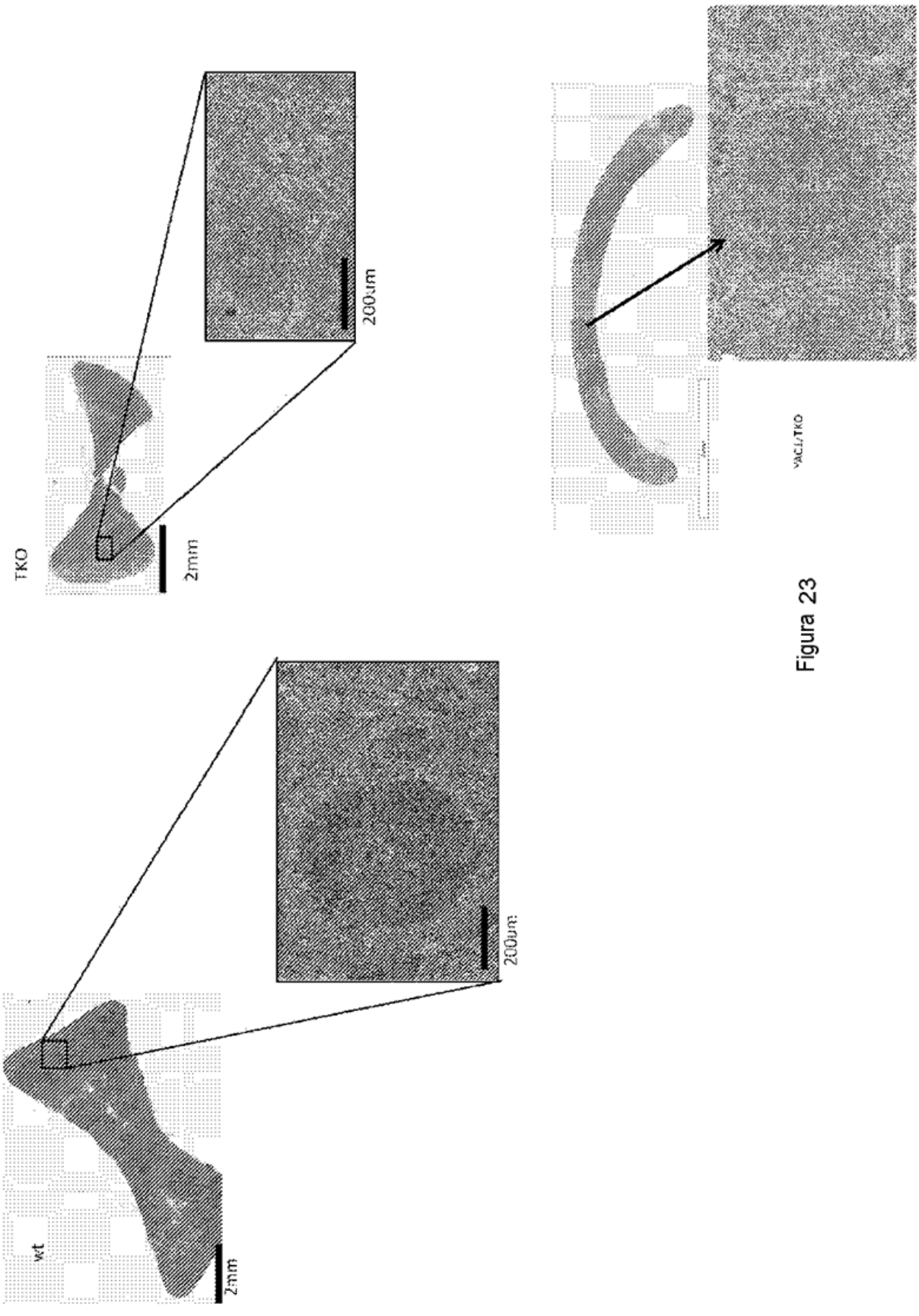


Figura 23

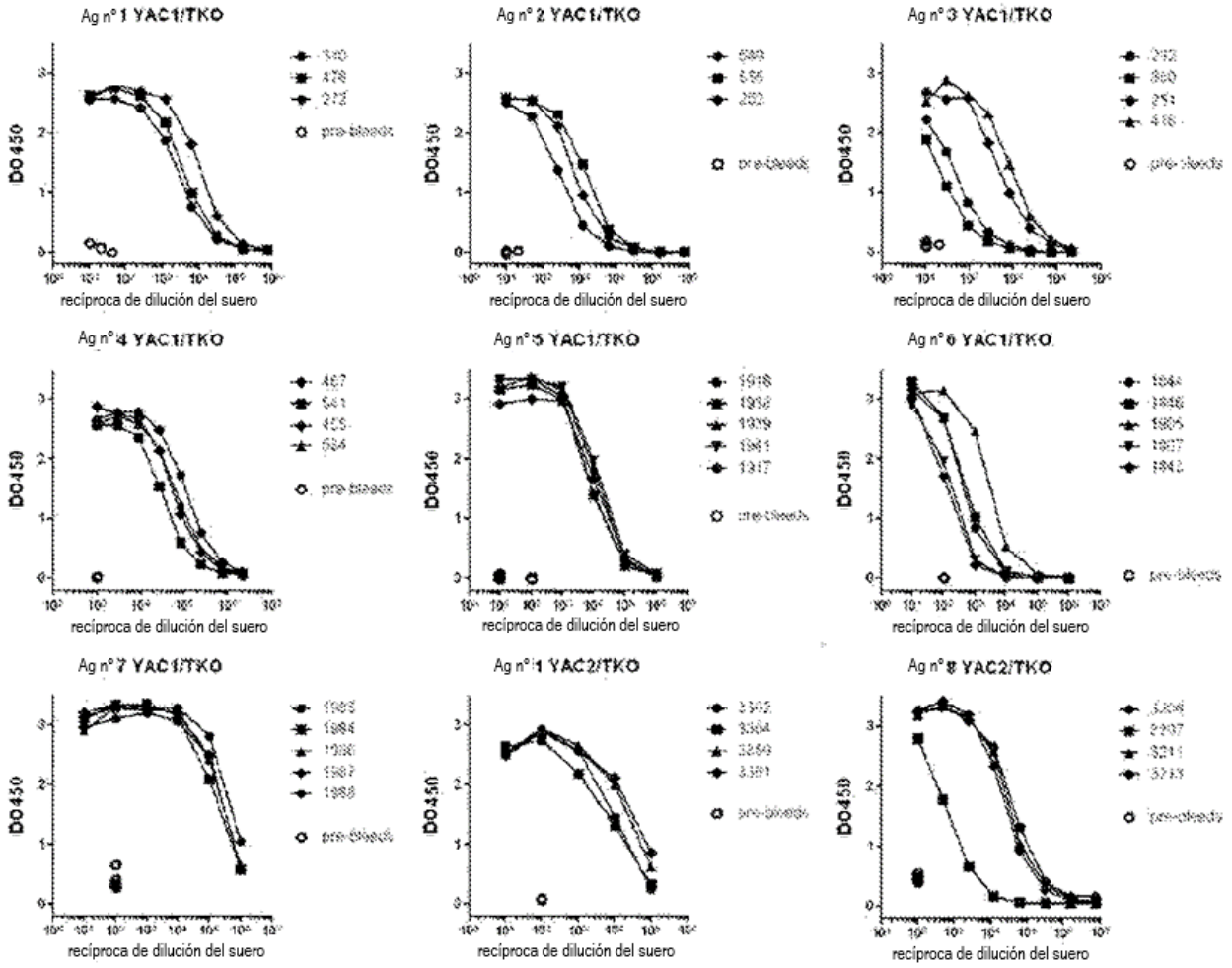

Ag n° 1 YAC1/TKO
Ag n° 2 YAC1/TKO
Ag n° 3 YAC1/TKO
Ag n° 4 YAC1/TKO
Ag n° 5 YAC1/TKO
Ag n° 6 YAC1/TKO
Ag n° 7 YAC1/TKO
Ag n° 1 YAC2/TKO
Ag n° 8 YAC2/TKO
DO450
recíproca de dilución del suero
pre-bleeds

Figura 24

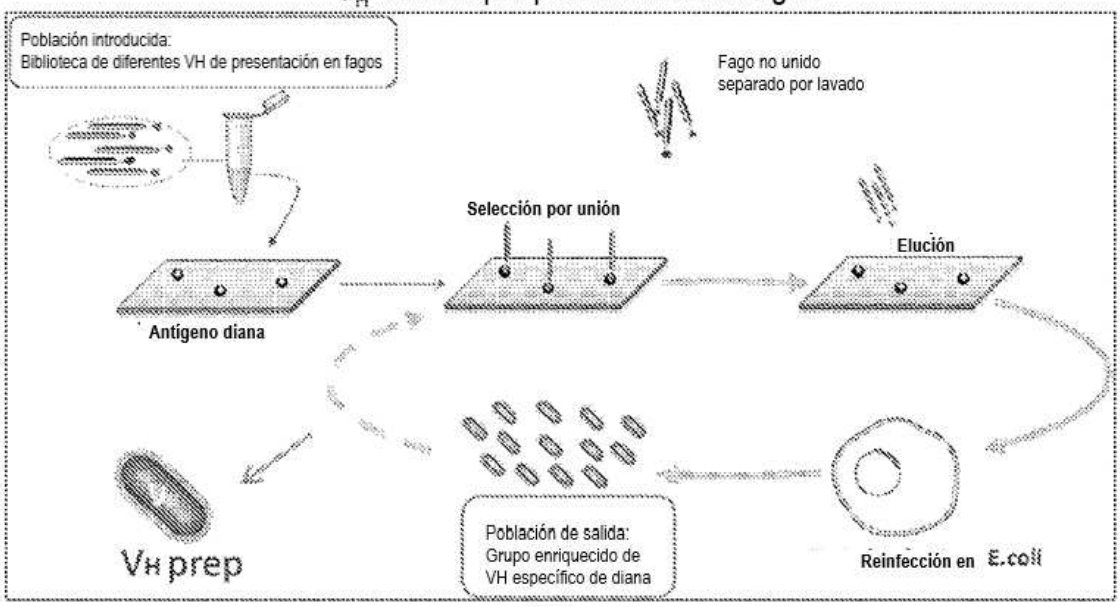


Extraer ARNm de bazo y ganglios linfáticos

RT-PCR de VH para cada familia de línea germinal

Clon de V_H en vector de presentación en fago

V_H aislado por presentación en fagos



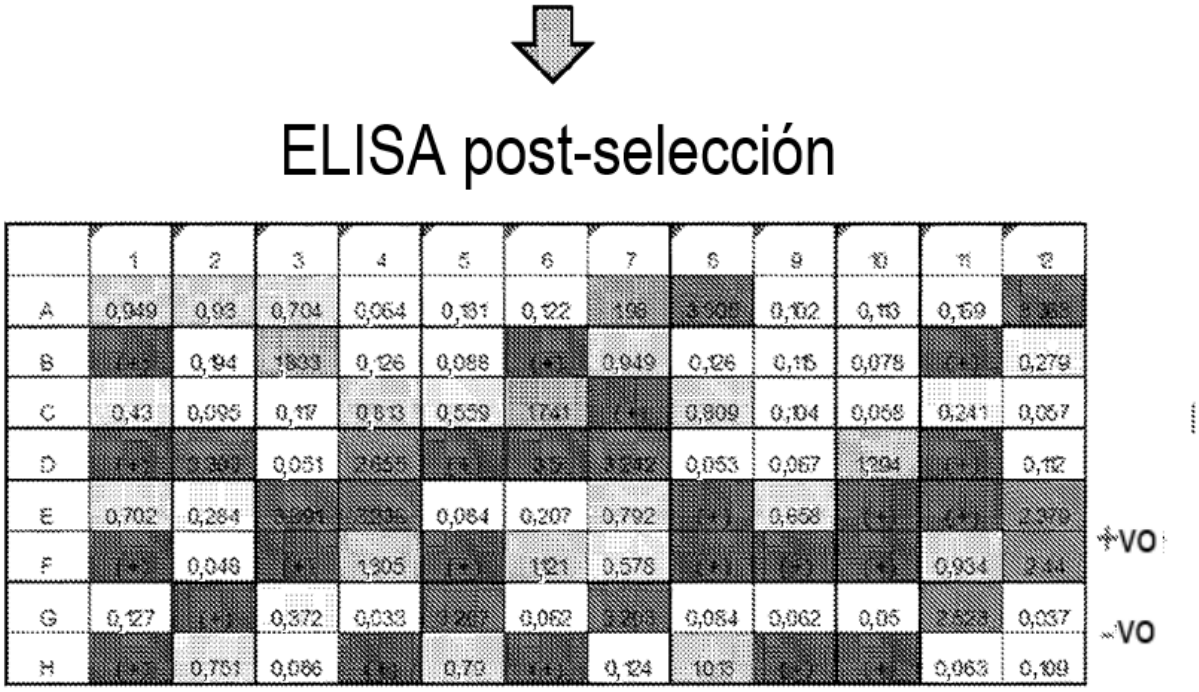


Figura 25

Biblioteca pre-selección

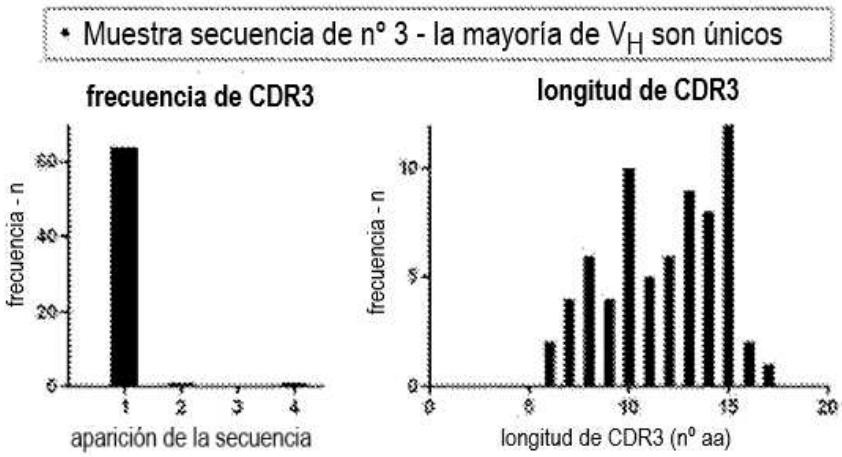
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,065	0,061	0,059	0,053	0,064	0,053	0,087	0,052	0,057	0,063	0,057	0,065	
B	0,076	0,071	0,072	0,078	0,098	0,102	0,081	0,072	0,078	0,082	0,303	0,083	
C	0,056	0,054	0,053	0,064	0,065	0,07	0,07	0,054	0,055	0,059	0,064	0,061	
D	0,048	0,058	0,052	0,056	0,056	0,05	0,047	0,051	0,049	0,052	0,049	0,085	
E	0,056	0,054	0,05	0,046	0,051	0,102	0,047	0,048	0,048	0,049	0,049	[illegible]	+VO
F	0,067	0,048	0,05	0,049	0,051	0,119	0,072	0,053	0,05	0,049	0,051	[illegible]	+VO
G	0,041	0,041	0,042	0,047	0,048	0,061	0,046	0,055	0,039	0,036	0,032	0,031	-VO
H	0,076	0,056	0,053	0,05	0,055	0,055	0,05	0,053	0,049	0,049	0,061	0,051	-VO

Después de un ciclo de biblioteca de selección

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,349	0,136	0,133	0,842	0,185	0,225	0,169	0,312	0,169	0,175	0,158	0,296	
B	0,593	0,261	0,587	0,238	0,338	0,188	0,239	0,801	0,52	0,09	0,357	0,475	
C	0,208	0,248	0,066	0,173	0,088	0,208	0,324	0,075	0,166	0,244	0,053	0,12	
D	0,115	0,809	0,226	0,219	0,07	0,272	0,361	0,334	0,084	0,328	0,153	0,481	
E	1,069	0,881	0,111	0,504	0,119	0,28	0,067	0,221	0,153	0,436	0,056	[illegible]	+VO
F	0,122	0,321	0,402	0,085	0,377	0,351	0,296	0,136	0,129	0,056	0,572	[illegible]	+VO
G	0,337	0,173	0,374	0,146	0,802	0,508	0,075	0,244	0,052	0,066	0,193	0,04	-VO
H	0,34	0,174	0,148	0,36	0,088	0,183	0,191	0,182	0,101	0,122	0,383	0,153	-VO

Figura 26

Ratón	Tamaño de biblioteca
nº1	$2,8x10^8$
nº2	$2,2x10^8$
nº3	$1,3x10^8$
nº4	7×10^8
Total	$1,3 \times 10^9$



a.

Figura 27

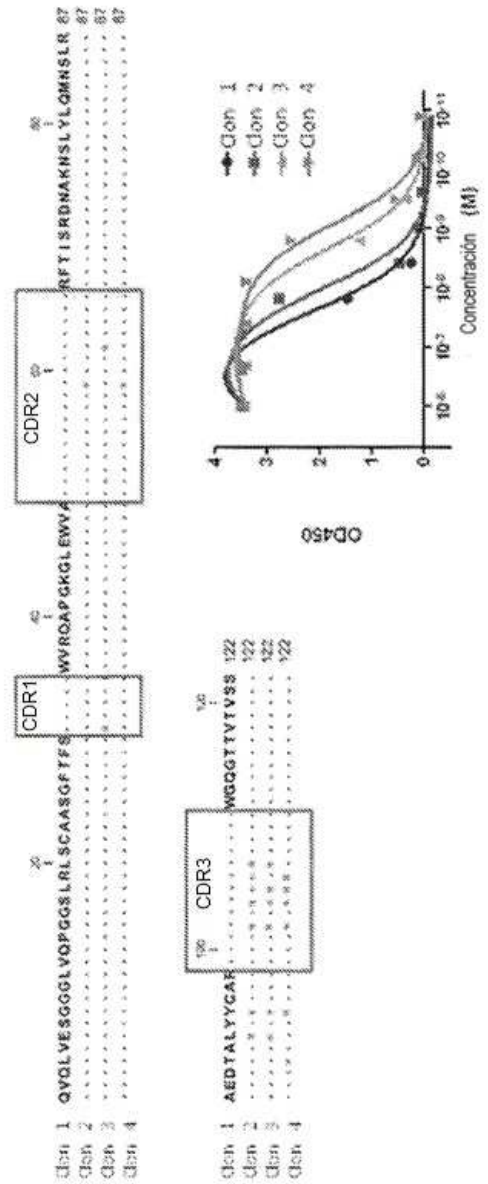
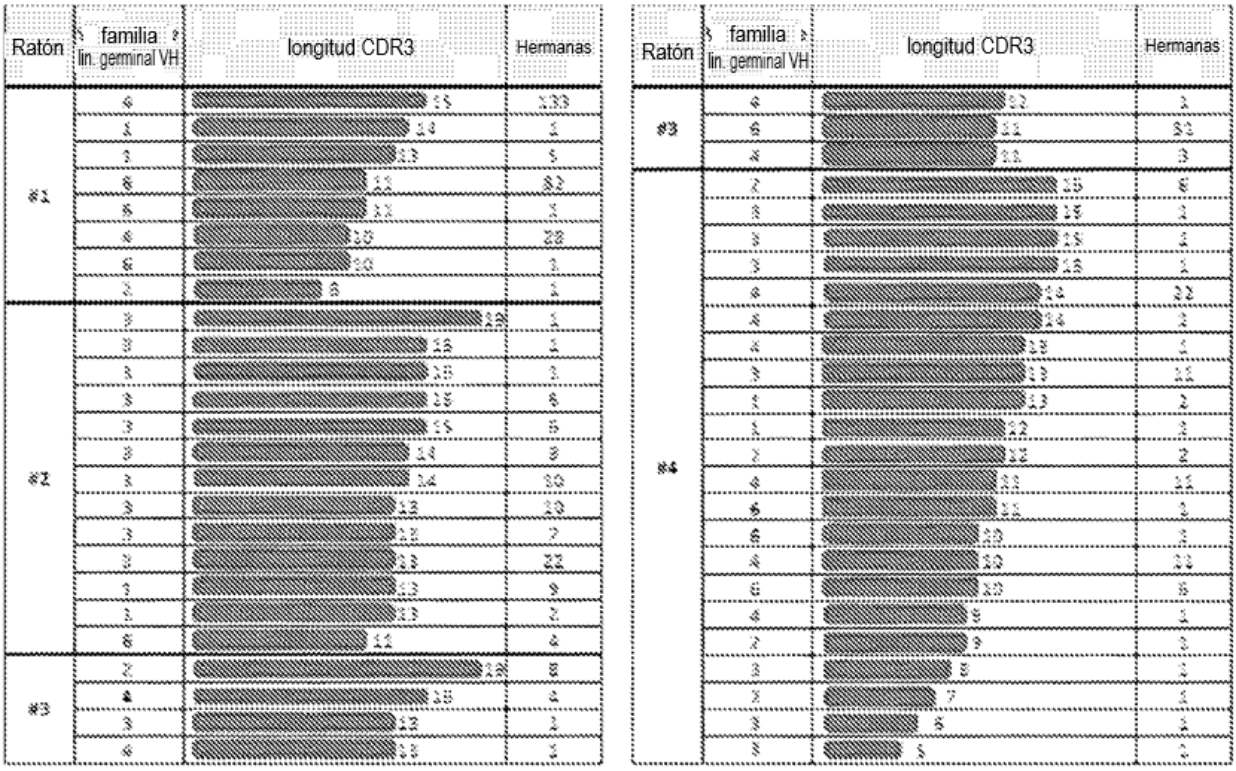


Figura 27 cont.



c.

Figura 27 cont.

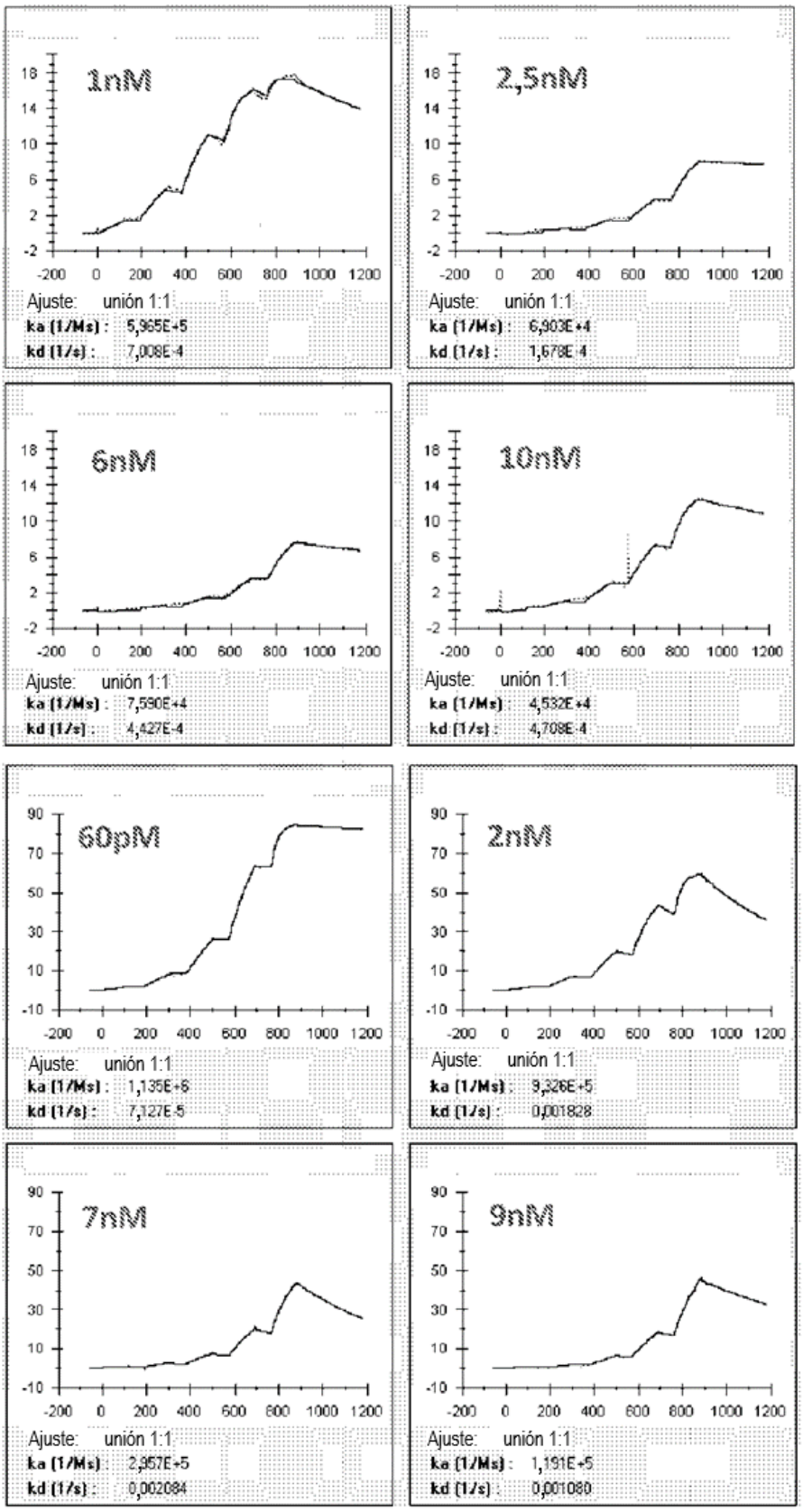

1nM
Ajuste: unión 1:1
ka (1/Ms): 5,965E+5
kd (1/s): 7,008E-4
2,5nM
Ajuste: unión 1:1
ka (1/Ms): 6,903E+4
kd (1/s): 1,678E-4
6nM
Ajuste: unión 1:1
ka (1/Ms): 7,590E+4
kd (1/s): 4,427E-4
10nM
Ajuste: unión 1:1
ka (1/Ms): 4,532E+4
kd (1/s): 4,708E-4
60pM
Ajuste: unión 1:1
ka (1/Ms): 1,135E+6
kd (1/s): 7,127E-5
2nM
Ajuste: unión 1:1
ka (1/Ms): 9,326E+5
kd (1/s): 0,001828
7nM
Ajuste: unión 1:1
ka (1/Ms): 2,957E+5
kd (1/s): 0,002084
9nM
Ajuste: unión 1:1
ka (1/Ms): 1,191E+5
kd (1/s): 0,001080

Figura 28

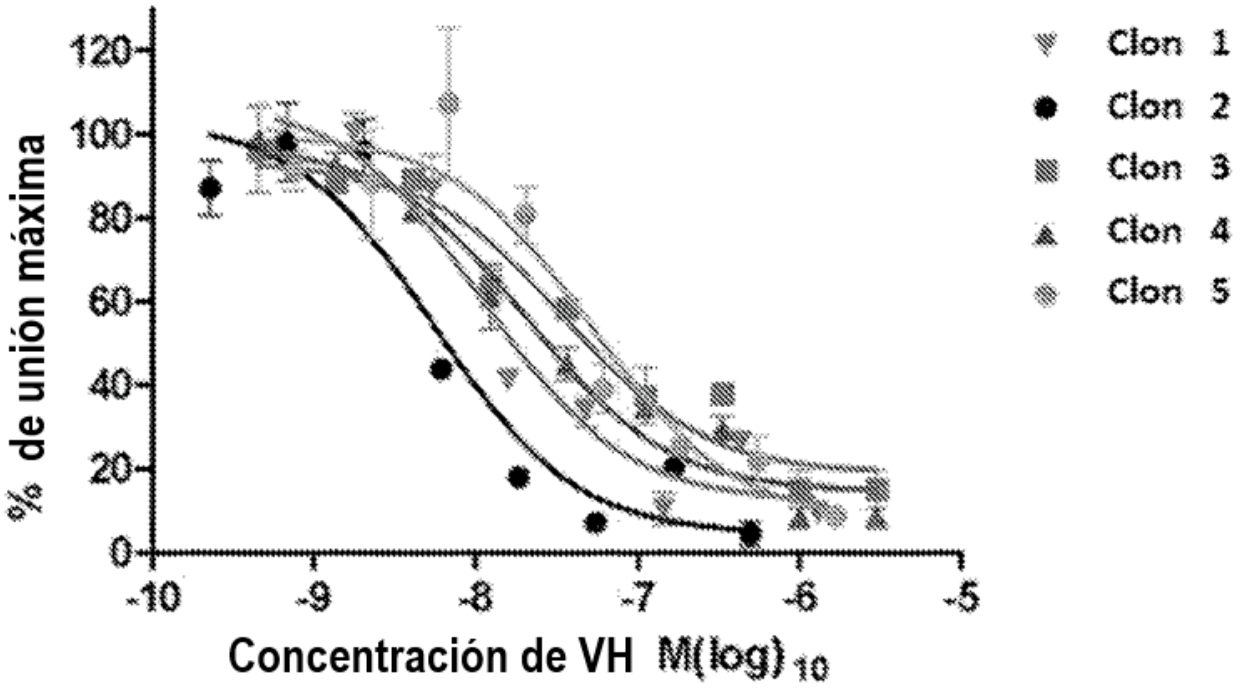
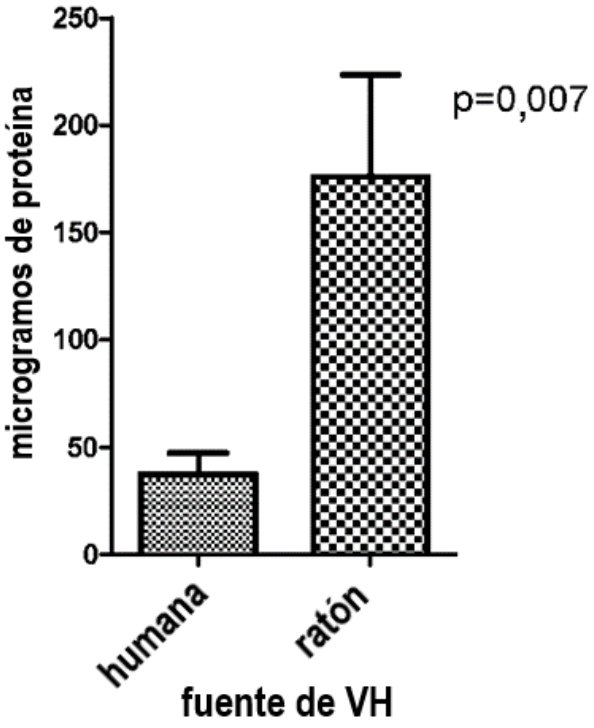
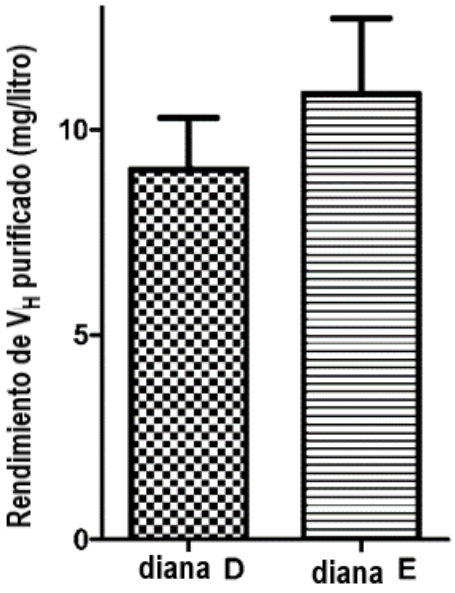

% de unión máxima
120
100
80
60
40
20
0
-10
-9
-8
-7
-6
-5
Concentración de VH M(log)10
Clon 1
Clon 2
Clon 3
Clon 4
Clon 5

Figura 29


250
200
150
100
50
0
microgramos de proteína
p=0,007
humana
ratón
fuente de VH

a.


Rendimiento de V_H purificado (mg/litro)
10
5
0
diana D
diana E

b.

Figura 30

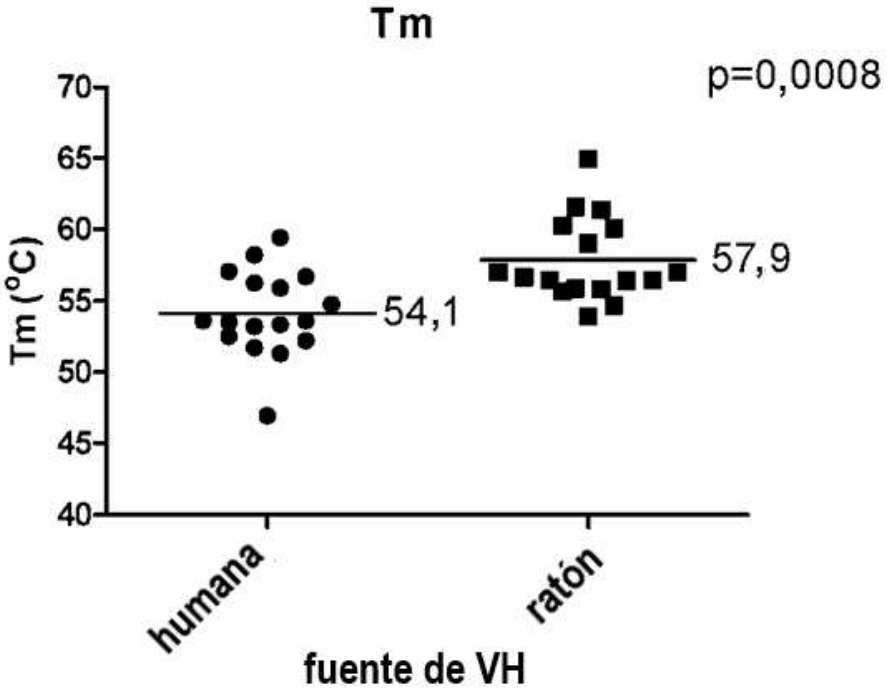


Figura 31

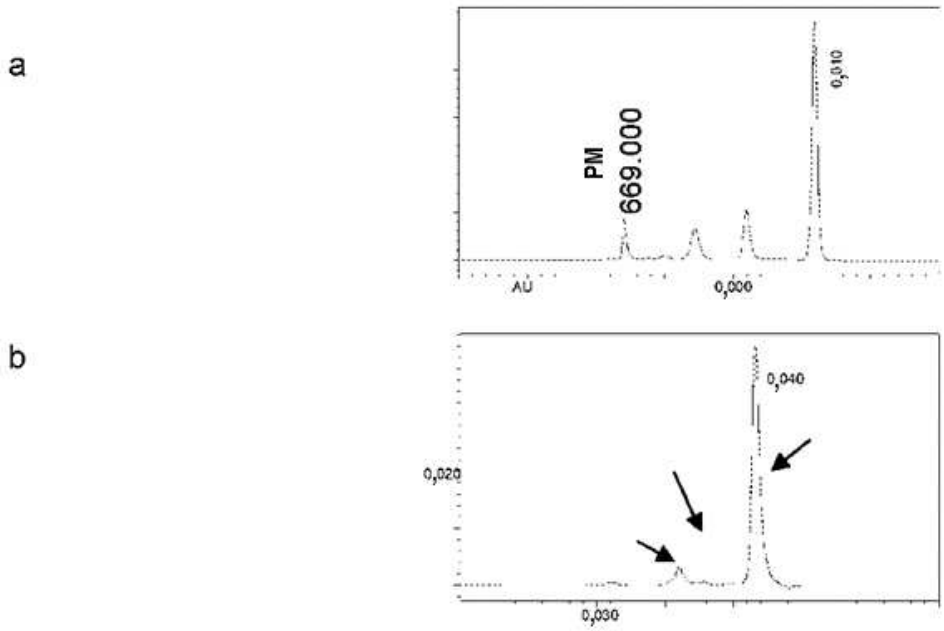


Figura 32

c

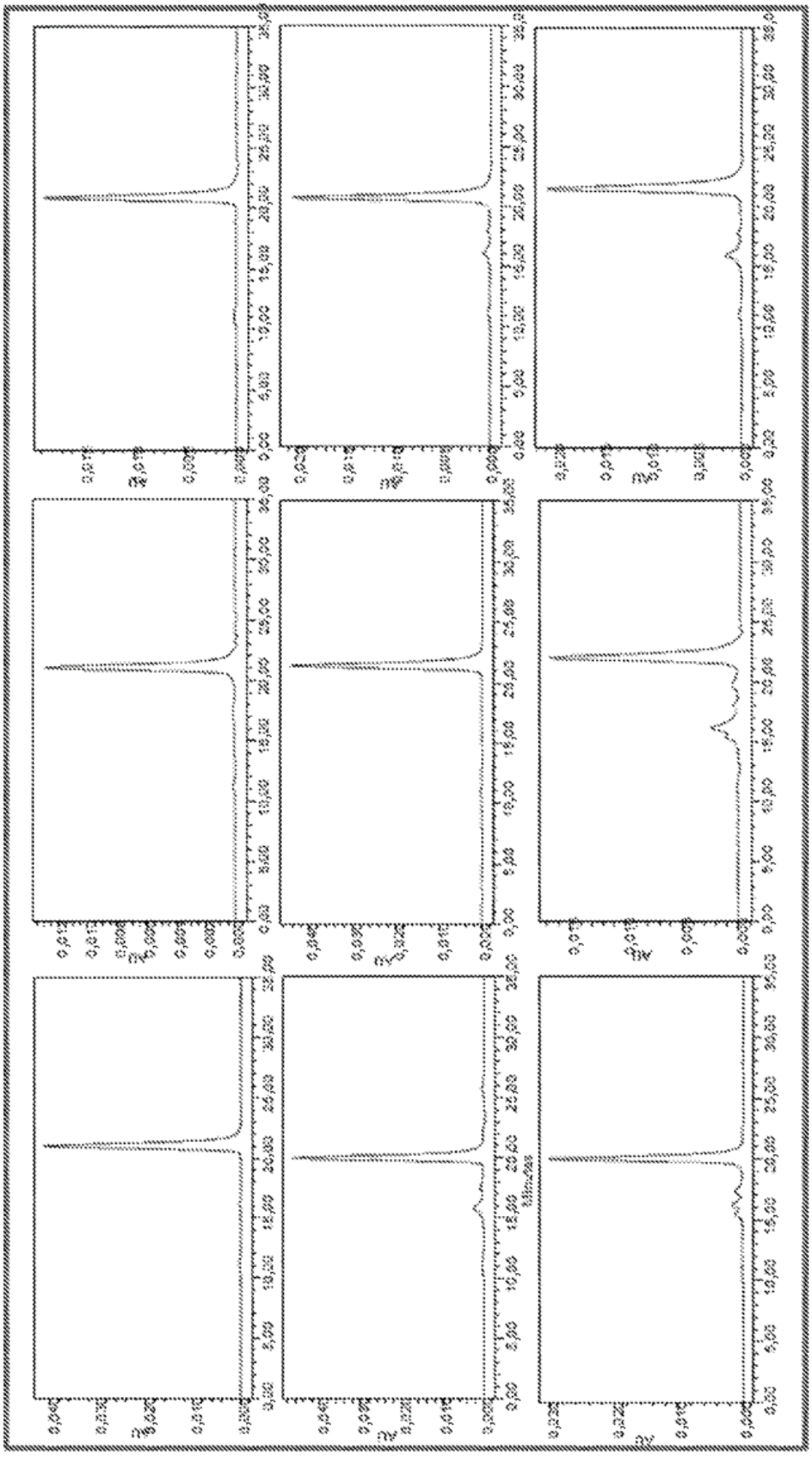


Figura 32 cont.

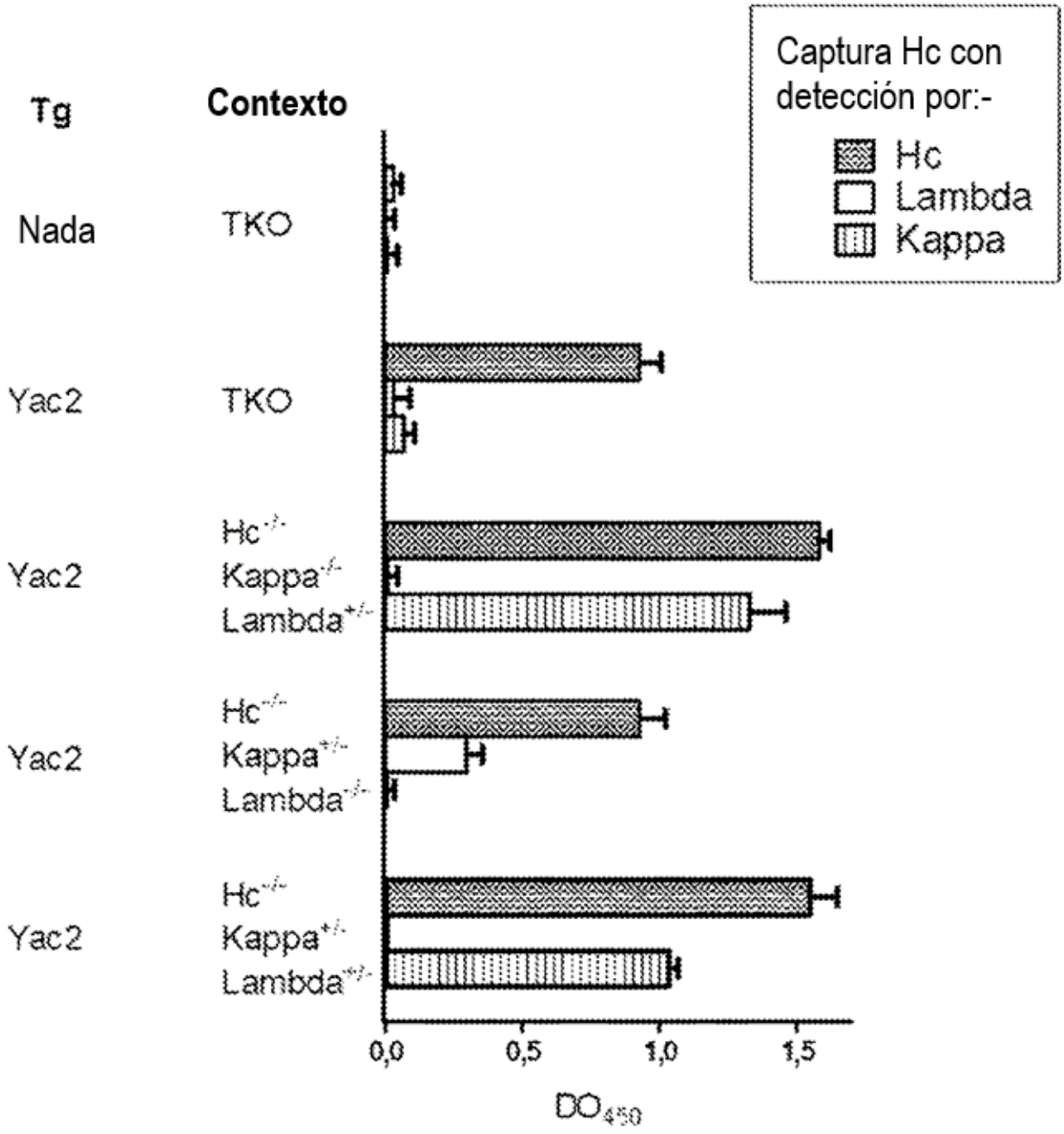

Captura Hc con detección por:-
Hc
Lambda
Kappa
Tg
Contexto
Nada
TKO
Yac2
TKO
Yac2
Hc-/-
Kappa-/-
Lambda+/-
Yac2
Hc-/-
Kappa+/-
Lambda-/-
Yac2
Hc-/-
Kappa+/-
Lambda+/-
0,0
0,5
1,0
1,5
DO450

Figura 33

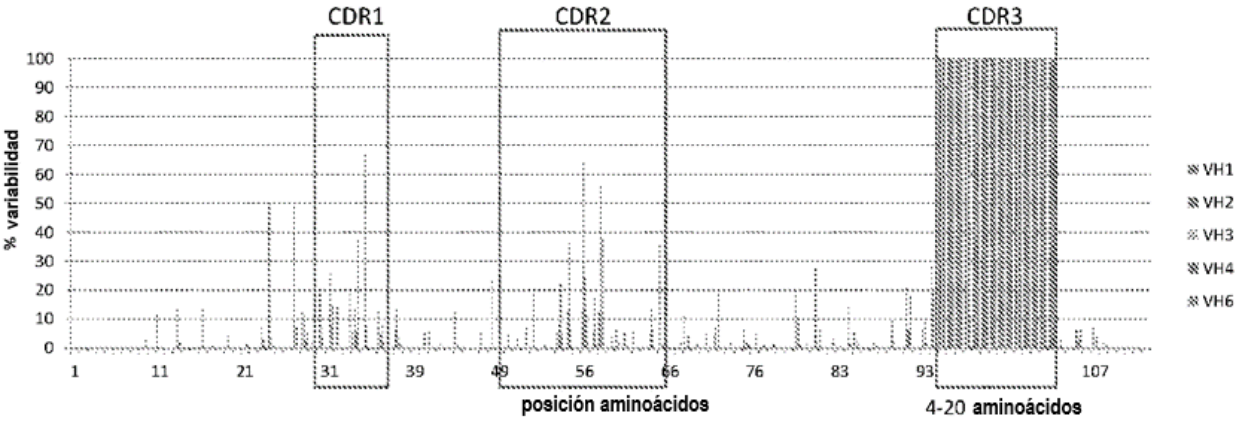

CDR1
CDR2
CDR3
% variabilidad
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1
11
21
31
39
49
56
66
76
83
93
107
posición aminoácidos
4-20 aminoácidos
VH1
VH2
VH3
VH4
VH6

Figura 34

i.)

VH	Tamaño biblioteca
VH1	$1,32 \times 10^{10}$
VH2	$4,7 \times 10^{9}$
VH3	$1,34 \times 10^{10}$
VH4	$2,6 \times 10^{9}$
VH6	$4,2 \times 10^{9}$
TOTAL	$3,81 \times 10^{10}$

ii.)

familia VH	nº clones analizados	número de veces que aparece la secuencia							
		1 x	2 x	3 x	4 x	5 x	6 x	7 x	8 x	9 x
VH1	51	49	1	0	0	0	0	0	0	0
VH2	59	41	1	1	1	0	0	0	0	1
VH3	82	74	4	0	0	0	0	0	0	0
VH4	73	67	3	0	0	0	0	0	0	0
VH6	70	63	2	0	0	1	0	0	0	0

iii.)

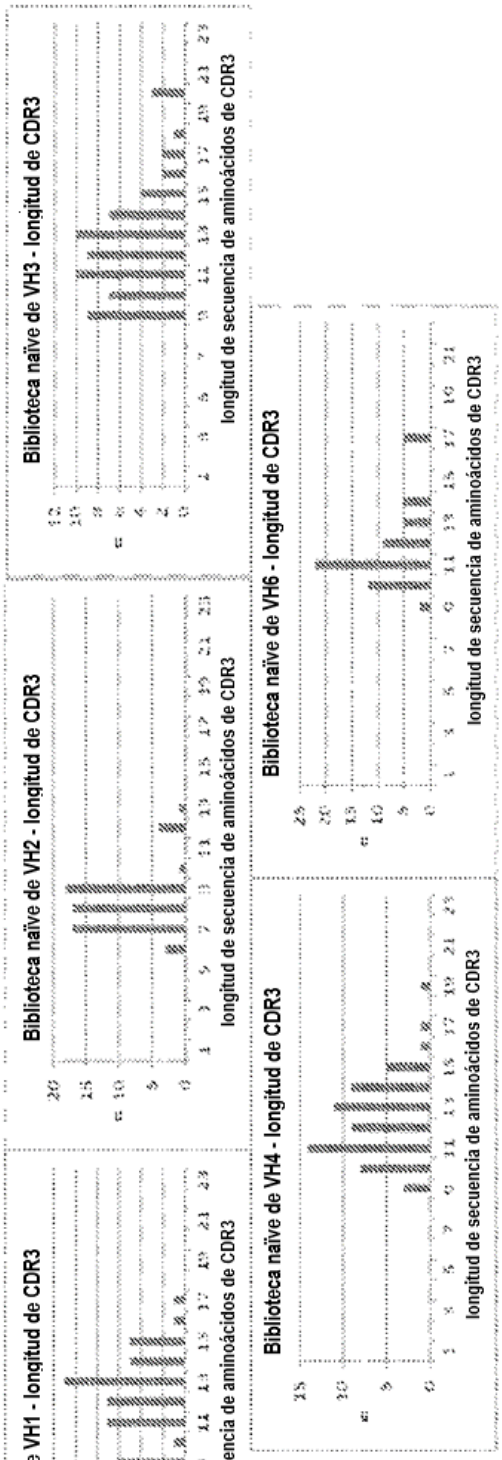


Figura 35