(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 994 445**

(51) Int. Cl.:

A01K 67/0278 (2014.01)
A61P 37/02 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2010** **E 22155461 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2024** **EP 4014729**

(54) Título: **Modelos de roedores y anticuerpos terapéuticos**

(30) Prioridad:

08.07.2009 GB 0911846
08.07.2009 US 22396009 P
28.07.2009 GB 0913102
17.06.2010 US 35566610 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2025

(73) Titular/es:

KYMAB LIMITED (100.00%)
The Bennet Building (B930), Babraham Research Campus
Cambridge CB22 3AT, GB

(72) Inventor/es:

BRADLEY, ALLAN;
LEE, E-CHIANG;
LIANG, QI y
WANG, WEI

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 994 445 T3

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

DESCRIPCIÓN

Modelos de roedores y anticuerpos terapéuticos

Antecedentes

La presente divulgación se refiere, entre otras cosas, a roedores y a células que se modifican para contener ADN exógeno tal como el ADN del gen de la inmunoglobulina humana, a su uso en medicina y al estudio de enfermedades, a métodos para la producción de roedores y células, y a anticuerpos y cadenas de anticuerpos producidos por roedores de este tipo y a derivados de los mismos.

Con el fin de sortear los problemas de la humanización de los anticuerpos, un cierto número de compañías se propusieron generar ratones con sistemas inmunitarios humanos. La estrategia utilizada fue inactivar los loci de las cadenas ligera y pesada en células ES y complementar estas lesiones genéticas con transgenes diseñados para expresar los genes de la cadena ligera y pesada humana. Aunque se podrían generar anticuerpos completamente humanos, estos modelos tienen varias limitaciones importantes:

(i) El tamaño de los loci de la cadena ligera y pesada (cada uno de varios Mb) hizo imposible introducir los loci completos en estos modelos. Como resultado, las líneas transgénicas recuperadas tenían un repertorio muy limitado de regiones V, la mayoría de las regiones constantes faltaban y las regiones potenciadoras distantes importantes no estaban incluidas en los transgenes.

(ii) La muy baja eficiencia de generar las líneas transgénicas de inserción grandes y la complejidad y el tiempo requerido para cruzar cada una de ellas con las cepas inactivadas de cadena pesada y ligera y volverlas homocigotas nuevamente, restringió el número de líneas transgénicas que podrían analizarse para una expresión óptima.

(iii) Las afinidades de los anticuerpos individuales rara vez alcanzaron las que podrían obtenerse de animales intactos (no transgénicos).

El documento WO20071 17410 describe construcciones quiméricas para expresar anticuerpos quiméricos.

El documento WO2010039900 describe células activadas y mamíferos que tienen un genoma que codifica anticuerpos quiméricos.

La presente divulgación proporciona, entre otros, un procedimiento para la generación en roedores de anticuerpos que comprenden una región variable de Ig humana y proporciona, además, modelos de roedores para la generación de anticuerpos de este tipo.

Sumario de la Invención

La invención es como se define en las reivindicaciones 1-15.

Cualquier referencia a mamíferos no humanos en esta memoria es a roedores.

Realizaciones dirigidas a roedores o células *per se* no están abarcadas por la redacción de las reivindicaciones, pero se consideran útiles para comprender la invención.

Figuras

Las Figuras 1 - 8 muestran un procedimiento iterativo para la inserción de una serie de BACs humanos en un locus de Ig de ratón.

Las Figuras 9 - 18 muestran con más detalle el procedimiento de las Figuras 1 - 8 para el locus IgH y kappa.

Las Figuras 19 y 20 muestran los principios detrás de la generación de anticuerpos en ratones quiméricos.

La Figura 21 muestra un posible sitio de inserción para el ADN humano en un cromosoma de ratón.

Las Figuras 22 - 26 describen un procedimiento iterativo alternativo para la inserción de una serie de BACs humanos en un locus de Ig de ratón.

Las Figuras 27 - 29 ilustran un mecanismo para la inversión de la región VDJ del huésped.

La Figura 30 ilustra la prueba del principio para la inserción de un plásmido utilizando un enfoque RMCE.

La Figura 31 ilustra la RMCE secuencial - integración en la superficie de contacto.

La Figura 32 ilustra la confirmación de la inserción secuencial en la superficie de contacto.

La Figura 33 ilustra la confirmación por PCR del curado en el extremo 3'.

La Figura 34 ilustra la inserción de BACnº1 y PCR Diagnostics.

Descripción General

Todas las coordenadas de nucleótidos para el ratón son de NCBI m37, versión 55.37h de ENSEMBL de abril de 2007 para la cepa de ratón C57BL/6J. Los nucleótidos humanos son de GRCh37, versión 55.37 de ENSEMBL de febrero de 2009 y de rata de RGSC 3.4 de diciembre de 2004, versión 55.34w de ENSEMBL.

En esta memoria se describen métodos para la construcción de loci de cadenas ligeras y pesadas humanas quiméricas en un roedor, por ejemplo, un ratón. La referencia al trabajo en ratones en esta memoria es solo a modo de ejemplo, y la referencia a ratones se considera que incluye la referencia a todos los roedores a menos que se desprenda lo contrario de la divulgación, prefiriéndose los ratones como roedor.

En un aspecto, la divulgación, que no es parte de la invención, se refiere a un mamífero no humano cuyo genoma comprende:

(a) una pluralidad de regiones V de IgH humana, una o más regiones D y una o más regiones J aguas arriba de la región constante de mamífero no humano huésped; y,

(b) opcionalmente una o más regiones V kappa de cadena ligera de Ig humana y una o más regiones J kappa de cadena ligera de Ig humana aguas arriba de la región constante kappa del mamífero no humano huésped y/o una o más regiones V lambda de cadena ligera de Ig humana y una o más regiones J lambda de cadena ligera de Ig humana aguas arriba de la región constante lambda de mamífero no humano huésped;

en donde el mamífero no humano es capaz de producir un repertorio de anticuerpos quiméricos o cadenas de anticuerpos que tienen una región constante de mamífero no humano y una región variable humana.

En un aspecto adicional, que no es parte de la invención, la divulgación se refiere a un mamífero no humano cuyo genoma comprende:

(a) una pluralidad de regiones V kappa de cadena ligera de Ig humana y una o más regiones J kappa de cadena ligera de Ig humana aguas arriba de la región constante kappa de mamífero no humano huésped y/o una pluralidad de regiones V lambda de cadena ligera de Ig humana y una o más regiones J lambda de cadena ligera de Ig humana aguas arriba de la región constante lambda de mamífero no humano huésped; y

(b) opcionalmente, una o más regiones V de IgH humana, una o más regiones D humanas y una o más regiones J humanas aguas arriba de la constante de mamífero no humano huésped;

en donde el mamífero no humano es capaz de producir un repertorio de anticuerpos quiméricos que tienen una región constante de mamífero no humano y una región variable humana.

Opcionalmente, el genoma del mamífero no humano se modifica para evitar la expresión de anticuerpos completamente específicos de la especie huésped.

En un aspecto, el ADN humano insertado comprende al menos el 50 % de los genes variables (V) de la cadena pesada humanos, tal como al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, y en un aspecto todos de los genes V humanos.

En un aspecto, el ADN humano insertado comprende al menos el 50 % de los genes de diversidad (D) de la cadena pesada humanos, tal como al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, y en un aspecto todos los genes D humanos.

En un aspecto, el ADN humano insertado comprende al menos el 50 % de los genes de unión a cadena pesada (J) humanos, tal como al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, y en un aspecto todos de los genes J humanos.

En un aspecto, el ADN humano insertado comprende al menos el 50 % de los genes variables (V) de la cadena ligera humana, tal como al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, y en un aspecto todos de los genes V de la cadena ligera humana.

En un aspecto, el ADN humano insertado comprende al menos el 50 % de los genes de unión a cadena ligera (J) humanos, tal como al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, y en un aspecto todos los genes de la cadena ligera J humana.

Los genes humanos insertados pueden derivar del mismo individuo o de diferentes individuos, o pueden ser sintéticos o representar secuencias consenso humanas.

Aunque el número de regiones V, D y J es variable entre individuos humanos, en un aspecto se considera que hay 51 genes V humanos, 27 genes D y 6 J en la cadena pesada, 40 genes V humanos y 5 genes J en la cadena ligera kappa. y 29 genes V humanos y 4 genes J en la cadena ligera lambda (Janeway y Travers, Immunobiology, tercera edición).

En un aspecto, el locus de la cadena pesada humana insertado en el mamífero no humano contiene el repertorio completo de las regiones V, D y J humanas, que en el genoma están en disposición funcional con las regiones constantes del roedor, de modo que se pueden producir anticuerpos quiméricos funcionales entre las regiones variables humanas y constantes de roedores. A este material genético de cadena pesada humana total insertado se le alude en esta memoria como región VDJ de IgH humana y comprende ADN de un genoma humano que codifica todos los exones que codifican las porciones V, D y J humanas y adecuadamente también los intrones asociados. De manera similar, la referencia a las regiones V y J kappa de la cadena ligera de Ig humana en esta memoria se refiere al ADN humano que comprende todos los exones que codifican las regiones V y J y adecuadamente también los intrones asociados del genoma humano. La referencia a las regiones V y J lambda de la cadena ligera de Ig humana en esta memoria se refiere al ADN humano que comprende todos los exones que codifican las regiones V y J y adecuadamente también los intrones asociados del genoma humano.

Las regiones variables humanas se insertan adecuadamente aguas arriba de la región constante de un roedor, comprendiendo esta última todo el ADN requerido para codificar la región constante completa o una porción suficiente de la región constante para permitir la formación de un anticuerpo quimérico eficaz capaz de reconocer específicamente un antígeno.

En un aspecto, los anticuerpos o cadenas de anticuerpos quiméricos tienen una parte de una región constante del huésped suficiente para proporcionar una o más funciones efectoras que se observan en los anticuerpos que se encuentran de forma natural en un mamífero huésped, por ejemplo, que son capaces de interactuar con los receptores FC y/o unirse al complemento.

Por lo tanto, la referencia a un anticuerpo o cadena de anticuerpo quimérico que tiene una región constante de roedor huésped no se limita a la región constante completa, sino que también incluye anticuerpos quiméricos o cadenas que tienen toda la región constante huésped, o una parte de la misma, suficiente para proporcionar una o más funciones efectoras. Esto también se aplica a roedores y a células y métodos descritos en esta memoria, en los que el ADN de la región variable humana puede insertarse en el genoma del huésped de manera que forme una cadena de anticuerpo quimérico con la totalidad o parte de una región constante del huésped. En un aspecto, la totalidad de una región constante huésped está enlazada operativamente al ADN de la región variable humana.

La región constante de roedor huésped en esta memoria es preferiblemente la región constante de tipo salvaje del huésped endógeno ubicada en el locus de tipo salvaje, según sea apropiado para la cadena pesada o ligera. Por ejemplo, el ADN de la cadena pesada humana se inserta adecuadamente en el cromosoma 12 de ratón, convenientemente adyacente a la región constante de la cadena pesada de ratón.

En un aspecto, la inserción del ADN humano, tal como la región VDJ humana, fija como objetivo la región entre el exón J4 y el locus Cμ en el locus IgH del genoma de ratón, y en un aspecto se inserta entre las coordenadas 114.667.090 y 114.665.190, adecuadamente en la coordenada 114.667.091. En un aspecto, la inserción del ADN humano, tal como la cadena ligera kappa VJ humana, fija como objetivo el cromosoma 6 de ratón entre las coordenadas 70.673.899 y 70.675.515, adecuadamente en la posición 70.674.734, o una posición equivalente en el locus lambda de ratón en el cromosoma 16.

En un aspecto, la región constante del mamífero no humano huésped para formar el anticuerpo quimérico puede estar en un locus cromosómico diferente (no endógeno). En este caso, el ADN humano insertado, tal como la(s) región(es) variable(s) humana(s) VDJ o VJ, puede insertarse en el genoma no humano en un sitio que es distinto del de la región constante pesada o ligera que se produce de forma natural. La región constante nativa puede insertarse en el genoma, o duplicarse dentro del genoma, en un locus cromosómico diferente a la posición nativa, de modo que esté en una disposición funcional con la región variable humana de modo que aún puedan producirse anticuerpos quiméricos de la divulgación.

En un aspecto, el ADN humano se inserta en la región constante de tipo salvaje del huésped endógena ubicada en el locus de tipo salvaje entre la región constante del huésped y la región VDJ del huésped.

La referencia a la ubicación de la región variable aguas arriba de la región constante del roedor significa que existe una ubicación relativa adecuada de las dos porciones de anticuerpo, variable y constante, para permitir que las regiones variable y constante formen un anticuerpo quimérico o cadena de anticuerpo *in vivo* en el mamífero.

Por lo tanto, el ADN humano insertado y la región constante del huésped están en disposición funcional entre sí para la producción de anticuerpos o cadenas de anticuerpos.

En un aspecto, el ADN humano insertado es capaz de expresarse con diferentes regiones constantes del huésped a través del cambio de isotipo. En un aspecto, el cambio de isotipo no requiere ni implica cambio trans. La inserción del ADN de la región variable humana en el mismo cromosoma que la región constante del huésped relevante significa que no hay necesidad de un cambio trans para producir un cambio de isotipo.

Como se explicó anteriormente, los loci transgénicos utilizados para los modelos de la técnica anterior eran de origen humano, por lo que incluso en aquellos casos en los que los transgenes eran capaces de complementar el locus del ratón para que los ratones produjeran células B que producían anticuerpos completamente humanos, las afinidades de los anticuerpos individuales rara vez alcanzaron los que podrían obtenerse de animales intactos (no transgénicos). La razón principal de esto (además del repertorio y los niveles de expresión arriba descritos) es el hecho de que los elementos de control del locus son humanos. Por lo tanto, los componentes de señalización, por ejemplo, para activar la hiper-mutación y la selección de anticuerpos de alta afinidad, se ven comprometidos.

Por el contrario, en la presente divulgación, se mantienen regiones constantes de roedor huésped y se prefiere que al menos un potenciador de un mamífero no humano u otra secuencia de control, tal como una región de cambio, se mantenga en disposición funcional con la región constante de mamífero, de modo que el efecto del potenciador u otra secuencia de control, como se ve en el mamífero huésped, se ejerce total o parcialmente en el animal transgénico.

Este enfoque anterior está diseñado para permitir que se muestre la diversidad completa del locus humano, para permitir los mismos altos niveles de expresión que se lograrían con las secuencias de control de mamíferos no humanos tales como los potenciadores, y es tal que la señalización en la célula B, por ejemplo el cambio de isotipo utilizando sitios de recombinación de cambio, todavía usaría secuencias de mamíferos no humanos.

Un mamífero que tenga un genoma de este tipo produciría anticuerpos quiméricos con regiones variables humanas y constantes de roedor, pero éstas podrían humanizarse fácilmente, por ejemplo, en una etapa de clonación. Además, la eficacia *in vivo* de estos anticuerpos quiméricos podría evaluarse en estos mismos animales.

En un aspecto, la región VDJ de IgH humana insertada comprende, en la configuración de la línea germinal, todas las regiones V, D y J y las secuencias intermedias de un ser humano.

En un aspecto, se insertan 800-1000 kb de la región VDJ de IgH humana en el locus de IgH de mamífero no humano y, en un aspecto, se inserta un fragmento de 940, 950 o 960 kb. De manera adecuada, esto incluye las bases 105.400.051 a 106.368.585 del cromosoma humano 14 (todas las coordenadas se refieren a NCBI36 para el genoma humano, Versión 54 de ENSEMBL y NCBIM37 para el genoma de ratón, en relación con la cepa de ratón C57BL/6J).

En un aspecto, el fragmento humano de IgH insertado consiste en las bases 105.400.051 a 106.368.585 del cromosoma 14. En un aspecto, el ADN de la cadena pesada humana insertado, tal como el ADN que consiste en las bases 105.400-051 a 106.368.585 del cromosoma 14, se inserta en el cromosoma 12 de ratón entre el extremo de la región J4 de ratón y la región Eμ, adecuadamente entre las coordenadas 114.667.091 y 114.665.190, adecuadamente en la coordenada 114.667.091.

En un aspecto, la región kappa VJ humana insertada puede comprender, en la configuración de la línea germinal, todas las regiones V y J y las secuencias intermedias de un ser humano.

Adecuadamente, esto incluye las bases 88.940.356 a 89.857.000 del cromosoma 2 humano, de manera adecuada, aproximadamente 917 kb. En un aspecto adicional, la inserción VJ de la cadena ligera comprende solo las agrupaciones proximales de segmentos V y segmentos J. Una inserción de este tipo sería de aproximadamente 473 kb.

En un aspecto, el ADN kappa de la cadena ligera humana, tal como el fragmento de IgK humana de las bases 88.940.356 a 89.857.000 del cromosoma 2 humano, se inserta adecuadamente en el cromosoma 6 de ratón entre las coordenadas 70.673.899 y 70.675.515, adecuadamente en la posición 70.674.734.

En un aspecto, la región lambda VJ humana comprende, en la configuración de la línea germinal, todas las regiones V y J y las secuencias intermedias de un ser humano.

Adecuadamente, esto incluye bases análogas a las seleccionadas para el fragmento kappa, del cromosoma 2 humano.

Todos los fragmentos humanos específicos arriba descritos pueden variar en longitud y, por ejemplo, pueden ser más largos o más cortos que los definidos anteriormente, tales como de 500 bases, 1 KB, 2 K, 3 K, 4 K, 5 KB, 10 KB, 20 KB, 30 KB, 40 KB o 50 KB o más, que comprenden adecuadamente la totalidad o parte de la región V(D)J humana, al tiempo que conservan preferiblemente el requisito de que la inserción final comprenda material genético humano que codifique la región de cadena pesada completa y la región de cadena ligera, según corresponda, como se describe arriba.

En un aspecto, el extremo 5' de la inserción humana arriba descrita aumenta de longitud. En los casos en los que la inserción se genera de forma escalonada, el aumento de longitud es generalmente con respecto al clon aguas arriba (5').

En un aspecto, el extremo 3' del último gen humano insertado, generalmente el último gen J humano a insertar, tiene menos de 2 kb, preferiblemente menos de 1 KB de la región de unión ser humano-ratón.

En un aspecto, el mamífero no humano comprende parte o la totalidad de la región VJ kappa de la cadena ligera humana como se describe en esta memoria, pero no la región VJ lambda de la cadena ligera humana.

En un aspecto adicional, el genoma comprende una inserción de genes V, D (solo cadena pesada) y J como se describe en esta memoria en el locus de la cadena pesada y un locus de la cadena ligera, o en el locus de la cadena pesada y ambos loci de la cadena ligera. Preferiblemente, el genoma es homocigoto en uno, en ambos o en los tres loci.

En otro aspecto, el genoma puede ser heterocigoto en uno o más de los loci tal como heterocigoto para el ADN que codifica una cadena de anticuerpo quimérico y una cadena de anticuerpo nativo (célula huésped). En un aspecto, el genoma puede ser heterocigoto para el ADN capaz de codificar 2 cadenas de anticuerpos diferentes de la divulgación, por ejemplo, que comprende 2 cadenas pesadas quiméricas diferentes o 2 cadenas ligeras quiméricas diferentes.

En un aspecto, la divulgación se refiere a métodos para producir un mamífero no humano o célula, como se describe en esta memoria, en donde la región VDJ de IgH humana se encuentra en un solo alelo y no en ambos alelos en el mamífero o la célula. En este aspecto, un mamífero o célula tiene el potencial de expresar tanto una cadena pesada de un anticuerpo huésped endógeno como una cadena pesada o ligera quimérica.

En un aspecto adicional, el ADN humano insertado, tal como la región VDJ de IgH humana, puede insertarse de tal manera que se enlaza operativamente en el genoma con una región constante mu de una región de un roedor, tal como una secuencia de rata.

Otras especies que no son humanas ni ratones de las que se pueden utilizar elementos de ADN en la presente divulgación incluyen conejos, llamas, dromedarios, alpacas, camellos y tiburones.

El enlace operable permite adecuadamente la producción de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que comprende la región variable humana

En un aspecto, la divulgación se refiere a una célula, o mamífero no humano, cuyo genoma comprende: una o más regiones kappa V de la cadena ligera de la Ig humana y una o más regiones kappa J de la cadena ligera de la Ig humana aguas arriba de todas o parte de la región constante kappa humana.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una célula, o mamífero no humano, cuyo genoma comprende: una o más regiones lambda V de la cadena ligera de la Ig humana y una o más regiones lambda J de la cadena ligera de la Ig humana aguas arriba de todas o parte de la región constante lambda humana.

De manera adecuada, las regiones VJ y C de la cadena ligera son capaces de formar cadenas de anticuerpos in vivo capaces de reaccionar específicamente con un antígeno.

En un aspecto de la divulgación, no existe secuencia codificante no humana alguna en la región de la cadena ligera insertada.

En aspectos de este tipo, se inserta una región kappa y/o lambda humana en el genoma, en combinación con la inserción de la región VDJ de la cadena pesada o parte de la misma, aguas arriba de la región constante de la cadena pesada del huésped como se describe en esta memoria.

Por lo tanto, la célula o el mamífero no humano de la divulgación, que no forma parte de la invención, puede comprender:

(a) una pluralidad de regiones V de IgH humana, una o más regiones D humanas y una o más regiones J humanas aguas arriba de la región constante del mamífero no humano huésped; y

(b) una o más regiones kappa V de la cadena ligera de la Ig humana y una o más regiones kappa J de la cadena ligera de la Ig humana aguas arriba de toda o parte de la región constante kappa de mamífero, en donde el mamífero no humano es capaz de producir un repertorio de anticuerpos que tienen una cadena de anticuerpo que comprende una región constante de mamífero no humano y una región variable humana.

La célula o el mamífero no humano de la divulgación, que no forma parte de la invención, puede comprender,
(a) una pluralidad de regiones V de IgH humana, una o más regiones D humanas y una o más regiones J humanas aguas arriba de la región constante de mamífero no humano; y
una o más regiones lambda V de la cadena ligera de la Ig humana y una o más regiones lambda J de la cadena ligera de la Ig humana aguas arriba de la región constante lambda de mamífero no humano huésped; en donde el mamífero no humano es capaz de producir un repertorio de anticuerpos que tienen una cadena de anticuerpo que comprende una región constante de mamífero no humano y una región variable humana.

En un aspecto, las secuencias de VJC del huésped de mamífero no humano se pueden inactivar de alguna manera, por mutación, o inversión, o por inserción del ADN de la región variable humana, o por cualquier otro medio.

En un aspecto, una o más secuencias de control de mamífero no humano tales como la(s) secuencia(s) potenciadora(s) se mantienen aguas arriba de la región constante Mu del roedor, adecuadamente en su posición nativa con respecto a la distancia desde la región constante.

En un aspecto, una o más secuencias de control de mamífero no humano tales como la(s) secuencia(s) potenciadora(s) se mantienen aguas abajo de la región constante Mu del roedor, adecuadamente en su posición nativa con respecto a la distancia desde la región constante.

En un aspecto, una secuencia de cambio de mamífero no humano, adecuadamente la secuencia de cambio endógena, se mantiene aguas arriba de la región constante Mu del roedor, adecuadamente en su posición nativa con respecto a la distancia desde la región constante.

En una ubicación de este tipo, las secuencias potenciadoras o de cambio del huésped son operativas in vivo con la(s) secuencia(s) de la región constante del huésped.

En un aspecto, una secuencia de cambio no es ni humana ni nativa en el mamífero no humano, por ejemplo, en un aspecto, una secuencia de cambio de mamífero no humano no es una secuencia de cambio de ratón o humana. La secuencia de cambio puede ser, por ejemplo, una secuencia de roedor o primate, o una secuencia sintética. En particular, la secuencia de cambio puede ser una secuencia de rata en la que el mamífero no humano es un ratón. A modo de ejemplo, una secuencia mu constante humana o de ratón puede colocarse bajo el control de una secuencia de cambio de una rata, o chimpancé, u otra secuencia de cambio, adecuadamente capaz de permitir que se produzca el cambio de isotipo in vivo.

La célula o el mamífero de la divulgación puede por lo tanto comprender una secuencia de cambio de mamífero humano o no humano y una región o regiones potenciadoras de mamífero humano o no humano. Preferiblemente, las secuencias de control son capaces de dirigir la expresión o controlar de otro modo la producción de anticuerpos que comprenden una región constante con la que están asociados. Una combinación prevista es un cambio de rata con secuencias potenciadoras de ratón y regiones constantes de ratón en una célula de ratón.

En un aspecto, que no forma parte de la invención, la divulgación se refiere a una célula, preferiblemente una célula no humana, o a un mamífero no humano que comprende un locus de la cadena pesada o de la cadena ligera de inmunoglobulina que tiene ADN de 3 o más especies. Por ejemplo, la célula o el animal puede comprender el ADN de la región constante de la célula huésped, una o más secuencias codificantes de V, D o J humanas y una o más regiones de ADN que no son humanas ni del huésped que son capaces de controlar una región del locus de inmunoglobulina, tal como una secuencia de cambio, promotor o potenciador que son capaces de controlar la expresión o el cambio de isotipo in vivo del ADN de Ig. En un aspecto, la célula o el animal es un ratón y comprende adicionalmente ADN humano del locus de Ig humana y adicionalmente una secuencia de ADN que no es de ratón, tal como una secuencia de ADN de rata, capaz de regular la secuencia de ratón o ADN humano.

En otro aspecto, que no forma parte de la invención, la divulgación se refiere a una célula, preferiblemente una célula no humana, o a un mamífero no humano que comprende un locus de la cadena pesada o de la cadena ligera de inmunoglobulina que tiene ADN de 2 o más genomas humanos diferentes. Por ejemplo, podría comprender secuencias V(D)J de la cadena pesada de más de un genoma humano dentro de una cadena pesada o ligera, o ADN VDJ de la cadena pesada de un genoma y secuencias VJ de la cadena ligera de un genoma diferente.

En un aspecto, que no forma parte de la invención, la divulgación se refiere a un fragmento de ADN o célula o mamífero no humano que comprende un locus de la cadena pesada o la cadena ligera de inmunoglobulina, o parte del mismo, que tiene ADN de 2 o más especies, en que una especie contribuye con una región no codificante tal como una región reguladora, y las otras regiones codificantes de especies tales como V, D, J o regiones constantes.

En un aspecto, el promotor humano y/u otros elementos de control que están asociados con las diferentes regiones V, D o J humanas se mantienen en el genoma del ratón.

En un aspecto adicional, uno o más de los elementos promotores, u otros elementos de control, de las regiones humanas, tales como las regiones V humanas, se optimizan para interactuar con la maquinaria transcripcional de un roedor.

De manera adecuada, una secuencia codificante humana puede colocarse bajo el control de un promotor de mamífero no humano apropiado, que permite que el ADN humano se transcriba de manera eficiente en la célula de mamífero no humano apropiada. En un aspecto, la región humana es una secuencia codificante de la región V humana, y una región V humana se coloca bajo el control de un promotor de mamífero no humano.

El reemplazo funcional del promotor humano u otras regiones de control por regiones promotoras o de control de mamífero no humano puede llevarse a cabo mediante el uso de recombinación u otras tecnologías de ADN recombinante, para insertar una parte de la región Ig humana (tal como una región V humana) en un vector (tal como un BAC) que contiene una región de Ig de mamífero no humano. La técnica de recombinación/recombinante reemplaza adecuadamente una porción del ADN de mamífero no humano (p. ej., ratón) por la región de Ig humana y, por lo tanto, coloca la región de Ig humana bajo el control del promotor de mamífero no humano u otra región de control. De manera adecuada, la región codificante humana para una región V humana reemplaza una secuencia codificante de la región V de ratón. De manera adecuada, la región codificante humana para una región D de humana reemplaza una secuencia codificante de la región D de ratón. De manera adecuada, la región codificante humana para una región J humana reemplaza una secuencia codificante de la región J de ratón. De esta forma, las regiones V, D o J humanas pueden colocarse bajo el control de un promotor de mamífero no humano, tal como un promotor de ratón.

En un aspecto, el único ADN humano insertado en la célula de mamífero no humano o en el animal son las regiones codificantes V, D o J, y éstas se colocan bajo el control de las secuencias reguladoras del huésped u otras secuencias (no humanas, no huésped). En un aspecto, la referencia a regiones codificantes humanas incluye tanto intrones como exones humanos o, en otro aspecto, simplemente exones y no intrones, que pueden estar en forma de ADNc.

Alternativamente, es posible utilizar recombinación u otras tecnologías de ADN recombinante para insertar un promotor de mamífero no humano (p. ej., ratón) u otra región de control, tal como un promotor para una región V, en un BAC que contiene una región Ig humana. La etapa de recombinación coloca luego una porción de ADN humano bajo el control del promotor de ratón u otra región de control.

Los enfoques descritos en esta memoria también se pueden utilizar para insertar algunas o todas las regiones V, D y J de la cadena pesada humana aguas arriba de una región constante de la cadena ligera, en lugar de aguas arriba de la región constante de la cadena pesada. Asimismo, algunas o todas las regiones V y J de la cadena ligera humana pueden insertarse aguas arriba de la región constante de la cadena pesada. La inserción puede ser en el locus de la región constante endógena, por ejemplo, entre la región constante endógena y la región J, y puede ser de algunos o todos los genes V, D o J solos, excluyendo secuencias promotoras o potenciadoras, o puede ser de algunos o todos los genes V, D o J con una o más o todas las secuencias promotoras o potenciadoras respectivas. En un aspecto, el repertorio completo de fragmentos V, D o J en la orientación de línea germinal puede insertarse aguas arriba y en disposición funcional con una región constante huésped.

Por lo tanto, la presente divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, permite insertar regiones V y/o D y/o J de un ser humano o cualquier especie en un cromosoma de una célula de una especie diferente que comprende una región constante, lo que permite expresar una cadena de anticuerpo quimérico.

En general, se prefiere la inserción de ADN de la región variable humana en o cerca del locus endógeno equivalente en el genoma del receptor, por ejemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 kb del límite (aguas arriba o aguas abajo) de un locus de inmunoglobulina huésped.

Por lo tanto, en un aspecto, la divulgación, que no está abarcada por la redacción de las reivindicaciones, pero que se considera útil para comprender la invención, se puede referir a una célula o un mamífero no humano, cuyo genoma comprende:

(a) una pluralidad de regiones V de IgH humana, una o más regiones D humanas y una o más regiones J humanas aguas arriba de la región constante del mamífero no humano huésped; y

(b) una o más regiones kappa V de la cadena ligera de la Ig humana y una o más regiones kappa J de la cadena ligera de la Ig humana y/o una o más regiones lambda V de la cadena ligera de la Ig humana y una o más regiones lambda J de la cadena ligera de la Ig humana;

en donde el mamífero no humano es capaz de producir un repertorio de anticuerpos quiméricos, o cadenas quiméricas ligeras o pesadas, que tienen una región constante de mamífero no humano y una región variable humana.

En un aspecto particular, que no está abarcado por la redacción de las reivindicaciones, pero que se considera útil para comprender la invención, el genoma de la célula o mamífero no humano comprende:

una pluralidad de regiones V de la IgH humana, una o más regiones D humanas y una o más regiones J humanas aguas arriba de la región constante del mamífero no humano huésped;

una o más regiones kappa V de la cadena ligera de la Ig humana y una o más regiones kappa J de la cadena ligera de la Ig humana aguas arriba de la región constante kappa del mamífero no humano huésped y

una o más regiones lambda V de la cadena ligera de la Ig humana y una o más regiones lambda J de la cadena ligera de la Ig humana aguas abajo de la región constante lambda del mamífero no humano huésped,

opcionalmente, en el que la región variable lambda humana puede insertarse aguas abajo del locus lambda del huésped endógeno en enlace operativo con una región constante lambda humana, de modo que el mamífero no humano o la célula puedan producir cadenas ligeras de anticuerpos completamente humanos y cadenas pesadas quiméricas.

El uso de los métodos descritos en esta memoria permite construir un locus de una manera escalonada mediante inserciones secuenciales y, por lo tanto, permite la inserción de ADN variable humano junto con ADN de la región constante humana o no humana en cualquier ubicación adecuada en el genoma de una célula huésped no humana. Por ejemplo, métodos de la divulgación pueden utilizarse para insertar ADN de la región variable de inmunoglobulina humana junto con ADN de la región constante del genoma huésped en cualquier parte del genoma de una célula huésped no humana, lo que permite que se produzca una cadena de anticuerpos quiméricos a partir de un sitio distinto del región pesada endógena. Cualquier construcción de ADN de la cadena pesada o de la cadena ligera humana arriba contemplada puede insertarse en cualquier posición deseada en el genoma de una célula huésped de roedor utilizando las técnicas descritas en esta memoria. Por lo tanto, la presente divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, también se refiere a roedores que tienen genomas que comprenden inserciones de este tipo.

La divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, se refiere también a un vector tal como BAC, que comprende una región V, D o J humana en una disposición funcional con un promotor de mamífero no humano u otra secuencia de control, de modo que la expresión de la región V, D o J humana está bajo el control del promotor de mamífero no humano en una célula del mamífero no humano, tal como una célula ES, en particular una vez insertada en el genoma de esa célula.

La divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, se refiere también a células y roedores que contienen células, células o mamíferos que tienen una región V, D o J humana en una disposición funcional con un promotor de mamífero no humano u otra secuencia de control, de modo que la expresión de la región V, D o J humana está bajo el control del promotor de mamífero no humano en el roedor.

En general, un aspecto de la divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada es una célula huésped de mamífero no humano capaz de expresar una secuencia codificante V, D o J humana bajo el control de un promotor huésped o región de control, teniendo la expresión capaz de producir un anticuerpo humanizado un dominio variable humano y una región constante de mamífero no humano.

En un aspecto, que no forma parte de la invención reivindicada, la divulgación se refiere a una célula, tal como una célula de no mamífero, tal como una célula ES, cuyo genoma comprende

(a) una pluralidad de regiones V de la IgH humana, una o más regiones D humanas y una o más regiones J humanas aguas arriba de la región constante de mamífero no humano huésped; y

(b) opcionalmente, una o más regiones V kappa de la cadena ligera de la Ig humana y una o más regiones J kappa de la cadena ligera de la Ig humana aguas arriba de la región constante kappa de mamífero no humano y una o más regiones lambda V de la cadena ligera de la Ig humana y una o más regiones lambda J de la cadena ligera de la Ig humana aguas arriba de la región constante lambda del mamífero no humano huésped.

En otro aspecto, que no forma parte de la invención reivindicada, la divulgación se refiere a una célula, tal como una célula de mamífero no humano, tal como una célula ES, cuyo genoma comprende

(a) una pluralidad de regiones V kappa de la cadena ligera de la Ig humana y una o más regiones J kappa de la cadena ligera de la Ig humana aguas arriba de la región constante kappa de mamífero no humano y/o una pluralidad de regiones lambda V de la cadena ligera de la Ig humana y una o más regiones lambda J de la cadena ligera de la Ig humana aguas arriba de la región constante lambda del mamífero no humano huésped;

(b) opcionalmente, una o más regiones V de la IgH humana, una o más regiones D humanas y una o más regiones J humanas aguas arriba de la región constante de mamífero no humano huésped.

En un aspecto, la célula es una célula ES capaz de convertirse en un roedor capaz de producir un repertorio de anticuerpos que son quiméricos, teniendo dichos anticuerpos quiméricos una región constante de roedor y una región variable humana. Opcionalmente, el genoma de la célula se modifica para evitar la expresión de anticuerpos completamente específicos para la especie huésped.

La divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, se refiere también a una línea celular que se cultiva a partir de células como las descritas en esta memoria o se deriva de ellas de otro modo, incluyendo una línea celular inmortalizada. La línea celular puede comprender genes V, D o J humanos insertados como se describe en esta memoria, ya sea en la configuración de la línea germinal o después de la reorganización que sigue a la maduración in vivo. La célula puede inmortalizarse mediante fusión con una célula tumoral para proporcionar una célula y una línea celular productoras de anticuerpos, o puede fabricarse mediante inmortalización celular directa.

La presente divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, se refiere también a vectores, que no forman parte de la invención, para uso en la divulgación. En un aspecto, vectores de este tipo son BACs (cromosomas artificiales bacterianos). Se apreciará que se pueden utilizar otros vectores de clonación en la divulgación y, por lo tanto, se puede considerar que la referencia a los BACs en esta memoria se refiere, en general, a cualquier vector adecuado.

En un aspecto, los BACs utilizados para la generación de ADN humano que se ha de insertar, tales como las regiones VDJ o VJ, se recortan, de modo que en la región VDJ o VJ humana final, o parte de la misma, en el mamífero no humano no se duplica ni se pierde secuencia alguna cuando se compara con la secuencia genómica humana original.

En un aspecto, que no forma parte de la invención reivindicada, la divulgación se refiere a un vector que comprende una inserción, que comprende preferiblemente una región de ADN humano de algunos del locus VDJ o VJ humano, flanqueada por ADN que no forma parte de ese locus. El ADN flanqueante puede comprender uno o más marcadores seleccionables o uno o más sitios de recombinación específicos del sitio. En un aspecto, el vector comprende 2 o más, tales como 3, sitios de recombinación específicos para el sitio heteroespecíficos e incompatibles. En un aspecto, los sitios de recombinación específicos para el sitio pueden ser sitios loxP, o variantes de los mismos, o sitios FRT o variantes de los mismos. En un aspecto, el vector comprende una o más secuencias ITR (siglas inglesas de repetición terminal invertida) de transposón.

En un aspecto, los roedores de la divulgación no producen de manera adecuada anticuerpos completamente humanizados. En un aspecto, esto se debe a que no se inserta ADN de la región constante humana. Alternativamente, no hay ADN de la región constante humana en el genoma capaz de formar un anticuerpo junto con el componente de ADN de la región variable humana insertado, por ejemplo, debido a una mutación dentro de cualquier ADN de la región constante humana o a la distancia de cualquier ADN humano de la región constante y ADN de la región variable humana.

En un aspecto, el ADN de la región constante de la cadena ligera humana se puede incluir en el genoma de la célula, de modo que se podría generar una cadena de anticuerpo humano lambda o kappa completamente humana, pero esto solo sería capaz de formar un anticuerpo con una cadena pesada quimérica, y no producir un anticuerpo completamente humano que tenga regiones variables y constantes humanas.

En un aspecto, el genoma del mamífero no humano se modifica para evitar la expresión de anticuerpos completamente específicos para la especie huésped. Anticuerpos completamente específicos para la especie huésped son anticuerpos que tienen regiones tanto variables como constantes del organismo huésped. En este contexto, el término 'específico' no pretende relacionarse con la unión de los anticuerpos producidos por las células o los animales de la divulgación, sino más bien con el origen del ADN que codifica esos anticuerpos.

En un aspecto, el genoma del mamífero no humano se modifica para evitar la expresión de los anticuerpos nativos (totalmente específicos para la especie huésped) en el mamífero mediante la inactivación de la totalidad o una parte de los loci de Ig del mamífero no humano huésped. En un aspecto, esto se logra mediante la inversión de toda o parte de la región VDJ del mamífero no humano, o región VJ, opcionalmente mediante la inserción de uno o más sitios de recombinasa específicos para el sitio en el genoma y luego el uso de estos sitios en la escisión o inversión mediada por recombinasa de todo o una parte del locus de Ig del mamífero no humano. En un aspecto, se puede emplear una doble inversión, la primera para retirar los V(D)Js del lugar endógeno y luego una inversión más local que los coloca en la orientación correcta. En un aspecto, se utiliza un solo sitio loxP para invertir la región VDJ de mamífero no humano en un locus centromérico o locus telomérico.

En un aspecto, el genoma del mamífero no humano en el que se inserta el ADN humano comprende regiones V, (D) y J endógenas, y las secuencias endógenas no se han suprimido.

La invención comprende un método para la inserción de múltiples fragmentos de ADN en una diana de ADN, de manera adecuada para formar una inserción contigua en la que los fragmentos insertados se unen directamente sin

secuencias intermedias. El método es especialmente aplicable a la inserción de un gran fragmento de ADN en un cromosoma del huésped que se puede llevar a cabo por etapas.

El método comprende la inserción de una primera secuencia de ADN en una diana, teniendo la secuencia una porción de vector de ADN y una primera secuencia de interés (X1); inserción de una segunda secuencia de ADN en la porción de vector de la primera secuencia, teniendo la segunda secuencia de ADN una segunda secuencia de interés (X2) y una segunda porción de vector; y luego escindir cualquier ADN de la secuencia de vector que separe X1 y X2 para proporcionar una secuencia contigua X1X2 o X2X1 dentro de la diana. El método comprende también la inserción de una o más secuencias de ADN adicionales, teniendo cada una de las secuencias de ADN una secuencia adicional de interés (X3,...) y una porción de vector adicional, en la porción de vector de la secuencia de ADN precedente, para construir un fragmento de ADN contiguo en la diana.

La diana de ADN para la inserción de la primera secuencia de ADN puede ser un sitio específico o cualquier punto del genoma de una célula particular.

El método general se describe en esta memoria en relación con la inserción de elementos de la región VDJ humana, pero es aplicable a la inserción de cualquier región de ADN, que no forma parte de la invención, de cualquier organismo y, en particular, a la inserción de fragmentos de ADN grandes de > 100 kB, tal como 100 - 250 kb, o incluso mayor, como el de TCR o HLA. Características y enfoques descritos en esta memoria con respecto a la inserción de VDJ pueden aplicarse igualmente a cualquiera de los métodos descritos.

En un aspecto, el ADN insertado es la región VDJ humana y está constituida en el genoma de una célula, tal como una célula ES, de una manera escalonada utilizando 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,11, 12, 13, 14, 15, 20 o más inserciones separadas para cada una de las regiones de cadena pesada. Fragmentos se insertan adecuadamente en el mismo o sustancialmente el mismo locus una célula, p. ej., el locus de una célula ES, uno tras otro, para formar la región VDJ completa, o parte de la misma. La presente divulgación, que no forma parte de la invención, también se refiere a células y animales no humanos que comprenden componentes intermedios en el proceso, cuyos genomas pueden comprender solo una región VDJ parcial tal como solo la región variable humana de ADN.

En otro aspecto, el método para producir un mamífero no humano transgénico comprende la inserción de regiones VDJ humanas aguas arriba de la región constante del mamífero no humano huésped mediante la inserción escalonada de múltiples fragmentos mediante recombinación homóloga, preferiblemente utilizando un proceso iterativo. Se insertan fragmentos mayores que 100 KB del locus VDJ humano para formar parte o una región VDJ completa después de la iteración final del proceso de inserción, como se describe en esta memoria.

En un aspecto, el proceso de inserción comienza en un sitio en donde se ha insertado un casete de iniciación en el genoma de una célula tal como una célula ES, lo que proporciona una región de fijación de objetivo única. En un aspecto, el casete de iniciación se inserta en el locus de la cadena pesada de mamífero no humano, para uso en la inserción de ADN de la cadena pesada humana. De manera similar, se puede insertar un casete de iniciación en el locus de la cadena ligera del mamífero no humano, para uso en la inserción de ADN de VJ de la cadena ligera humana. El casete de iniciación comprende de manera adecuada una secuencia de la cadena principal del vector con la que un vector que tiene un fragmento de ADN humano en la misma secuencia de la cadena principal puede recombinarse para insertar el ADN humano en el genoma de una célula (p. ej. ES), y de manera adecuada un marcador de selección, tal como un marcador de selección negativa. Adecuadamente, la secuencia de la cadena principal del vector es la de una colección de BACs, para permitir que los BACs se utilicen en la construcción de las células ES y mamíferos. Sin embargo, la secuencia de la cadena principal del vector puede ser cualquier secuencia que sirva como un sitio diana en el que se pueda insertar una secuencia homóloga, por ejemplo mediante recombinación homóloga y RMCE, y preferiblemente no es ADN que codifique cualesquiera de las regiones VDJ o constante.

En un aspecto, la inserción del primer fragmento de ADN en un casete de iniciación va seguida de la inserción de un segundo fragmento de ADN en una porción del primer fragmento de ADN, de manera adecuada una parte de la cadena principal del vector del segundo fragmento de ADN. En un aspecto, un fragmento de ADN insertado comprende una parte de la región VDJ humana flanqueada por secuencias 5' y/o 3' que no son de la región VDJ humana. En un aspecto, las secuencias flanqueantes 5' y/o 3' pueden contener cada una uno o más marcadores seleccionables, o pueden ser capaces de crear un sistema seleccionable una vez insertado en el genoma. En un aspecto, una o ambas secuencias flanqueantes pueden eliminarse del genoma in vitro o in vivo, después de la inserción. En un aspecto, el método comprende la inserción de un fragmento de ADN seguido de la selección de los extremos 5' y 3' del fragmento insertado que flanquea el ADN de VDJ humano. En un aspecto, la inserción iterativa se realiza mediante la inserción de fragmentos de ADN en el extremo 5' del fragmento insertado anterior, y en este aspecto puede haber una deleción in vivo del ADN del vector que separa las secuencias de ADN humano insertadas, para proporcionar una secuencia contigua de ADN humano.

En un aspecto, la inserción de ADN de VDJ humano en un genoma puede lograrse sin dejar ADN flanqueante alguno en el genoma, por ejemplo mediante escisión de ADN mediada por transposasa. Una transposasa adecuada es la transposasa Piggybac.

En un aspecto, el primer fragmento de la región variable humana se inserta mediante recombinación homóloga en la secuencia de la cadena principal del casete de iniciación y luego el ADN de cualquier marcador de selección negativa y el casete de iniciación se eliminan posteriormente mediante recombinación entre secuencias diana de recombinasa, tales como FRT utilizando en este ejemplo, expresión de FLPasa. Generalmente, las inserciones fijadas como objetivo repetidas en la secuencia de iniciación de la cadena principal (p. ej., BAC) y la subsiguiente eliminación por reordenamiento entre las secuencias diana de la recombinasa se repiten para construir la región VDJ humana completa aguas arriba de la región constante del no mamífero huésped.

En un aspecto, en el método se puede utilizar un marcador o sistema seleccionable. El marcador puede generarse tras la inserción de un fragmento de ADN en un genoma, por ejemplo formando un marcador seleccionable en unión con un elemento de ADN ya presente en el genoma.

En un aspecto, el genoma de la célula (p. ej., ES) no contiene 2 marcadores seleccionables idénticos al mismo tiempo durante el proceso. Puede verse que el proceso iterativo de inserción y selección puede llevarse a cabo utilizando solo 2 marcadores de selección diferentes, como se describe en los ejemplos en esta memoria y, por ejemplo, el tercer marcador seleccionable puede ser idéntico al primer marcador, ya que en el momento de la inserción del tercer fragmento de vector, se han eliminado el primer fragmento de vector y el primer marcador.

En un aspecto, se confirma un evento de inserción correcto antes de pasar a la siguiente etapa de cualquier proceso de clonación multietapa, por ejemplo, mediante la confirmación de la estructura BAC utilizando matrices genómicas de alta densidad para seleccionar células ES para identificar aquellas con inserciones BAC intactas, secuenciación y verificación por PCR.

BACs adecuados están disponibles del centro de Sanger, véase "A genome-wide, end-sequenced 129Sv BAC library resource for targeting vector construction". Adams DJ, Quail MA, Cox T, van der Weyden L, Gorick BD, Su Q, Chan WI, Davies R, Bonfield JK, Law F, Humphray S, Plumb B, Liu P, Rogers J, Bradley A. Genomics. Diciembre de 2005;86(6):753-8. Epub 27 de octubre de 2005. The Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridgeshire CB10 1SA, Reino Unido. BACs que contienen ADN humano también están disponibles, por ejemplo, en Invitrogen. Una colección adecuada se describe en Osoegawa K et al, Genome Research 2001. 11: 483-496.

En un aspecto, un método de la divulgación comprende específicamente:

(1) inserción de un primer fragmento de ADN en una célula ES no humana, conteniendo el fragmento una primera porción de ADN de la región VDJ o VJ humana y una primera porción del vector que contiene un primer marcador seleccionable;

(2) opcionalmente la deleción de la parte a de la primera porción del vector;

(3) inserción de un segundo fragmento de ADN en una célula ES no humana que contiene el primer fragmento de ADN, produciéndose la inserción dentro de la primera porción del vector, conteniendo el segundo fragmento de ADN una segunda porción de la región VDJ o VJ humana y una segunda porción del vector que contiene un segundo marcador seleccionable,

(4) deleción del primer marcador seleccionable y la primera porción del vector, preferiblemente por acción de una enzima recombinasa;

(5) inserción de un tercer fragmento de ADN en una célula ES no humana que contiene el segundo fragmento de ADN, produciéndose la inserción dentro de la segunda porción del vector, conteniendo el tercer fragmento de ADN una tercera porción de la región VDJ o VJ humana y una tercera porción del vector que contiene un tercer marcador seleccionable,

(6) deleción del segundo marcador seleccionable y la segunda porción del vector; y

(7) repetición de las etapas de inserción y deleción, según sea necesario, para los fragmentos cuarto y posteriores de las regiones VDJ o VJ humanas, según sea necesario, para producir una célula ES con una parte o la totalidad de la región VDJ o VJ humana insertada como se describe en esta memoria, y de manera adecuada para eliminar todas las porciones de vector dentro del genoma de la célula ES.

En otro aspecto, la divulgación comprende

1 inserción de ADN que forma un casete de iniciación en el genoma de una célula ES de roedor;

2 inserción de un primer fragmento de ADN en el casete de iniciación, comprendiendo el primer fragmento de ADN una primera porción de un ADN humano y una primera porción de vector que contiene un primer marcador seleccionable o genera un marcador seleccionable tras la inserción;

3 eliminación opcional de parte del ADN del vector

4 inserción de un segundo fragmento de ADN en la porción de vector del primer fragmento de ADN, conteniendo el segundo fragmento de ADN una segunda porción de ADN humano y una segunda porción de vector, conteniendo la segunda porción de vector un segundo marcador seleccionable, o generando un segundo marcador seleccionable tras la inserción;

5 opcionalmente, eliminación de cualquier ADN del vector para permitir que el primer y el segundo fragmento de ADN humano formen una secuencia contigua; y

6 repetición de las etapas de inserción de ADN de VDJ humano y eliminación de ADN de vector, según sea necesario, para producir una célula con todo o parte de la región VDJ o VJ humana, suficiente para ser capaz de generar un anticuerpo quimérico en unión con una región constante de huésped,

en donde la inserción de uno, o más, o todos los fragmentos de ADN utiliza recombinación específica para el sitio.

En un aspecto, el mamífero no humano es capaz de generar una diversidad de al menos 1×10^6 combinaciones de secuencias de inmunoglobulina quiméricas funcionales diferentes.

En un aspecto, la fijación de objetivo se lleva a cabo en células ES derivadas de la cepa de ratón C57BL/6N, C57BL/6J, 129S5 o 129Sv.

En un aspecto, animales no humanos, tales como ratones, se generan en un entorno deficiente en RAG-1 u otro entorno genético adecuado que impide la producción de linfocitos B y T maduros del huésped.

En un aspecto, el roedor es un ratón.

Las células ES descritas en esta memoria, pero que no forman parte de la invención reivindicada, se pueden utilizar para generar animales utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, que comprenden la inyección de la célula ES en un blastocisto, seguido de la implantación de blastocistos quiméricos en hembras para producir descendencia que se puede criar y seleccionar para recombinantes homocigotos que tienen la inserción requerida. En un aspecto, la divulgación se refiere a un animal quimérico compuesto por tejido derivado de células ES y tejido derivado de embrión huésped. En un aspecto, la divulgación se refiere a animales de la generación posterior alterados genéticamente, que incluyen animales que tienen recombinantes homocigotos para las regiones VDJ y/o VJ.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo específico para un antígeno deseado, comprendiendo el método inmunizar un mamífero no humano como antes con el antígeno deseado y recuperar el anticuerpo (véase, p. ej., Harlow, E. y Lane, D. 1998, 5ª edición, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY; y Pasqualini y Arap, Proceedings of the National Academy of Sciences (2004) 101 :257-259). De manera adecuada, se administra una cantidad inmunogénica del antígeno. La divulgación, que no es parte de la invención, también se refiere a un método para detectar un antígeno diana, que comprende detectar un anticuerpo producido como se indicó arriba con un agente de detección secundario que reconoce una porción de ese anticuerpo.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo completamente humanizado, que comprende inmunizar un mamífero no humano transgénico como antes producido de acuerdo con los métodos de la invención con el antígeno deseado, recuperar el anticuerpo o las células que expresan el anticuerpo y luego reemplazar la región constante de mamífero no humano por una región constante humana. Esto se puede hacer mediante técnicas de clonación estándares a nivel de ADN para reemplazar la región constante de mamífero no humano por una secuencia de ADN de la región constante humana apropiada - véase, p. ej., Sambrook, J y Russell, D. (2001, 3ª edición) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY).

En un aspecto adicional, la divulgación que no queda abarcada por la redacción de las reivindicaciones, pero que se considera útil para comprender la invención, se refiere a anticuerpos humanizados y cadenas de anticuerpos producidos de acuerdo con la presente divulgación, tanto en forma quimérica como completamente humanizada, y al uso de dichos anticuerpos en medicina. La divulgación también se refiere a una composición farmacéutica que comprende anticuerpos de este tipo y un soporte u otro excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las cadenas de anticuerpos que contienen secuencias humanas, tales como las cadenas de anticuerpos humanos-no humanos quiméricos, se consideran humanizadas en esta memoria en virtud de la presencia de la región de regiones codificantes de proteínas humanas. Los anticuerpos totalmente humanizados se pueden producir a partir del ADN que codifica una cadena de anticuerpo quimérico de la divulgación utilizando técnicas estándares.

Métodos para la generación de anticuerpos tanto monoclonales como policlonales son bien conocidos en la técnica, y la presente divulgación se refiere a anticuerpos tanto policlonales como monoclonales de anticuerpos quiméricos o

totalmente humanizados producidos en respuesta a la exposición a antígenos en mamíferos no humanos de la presente divulgación.

En aún un aspecto adicional, los anticuerpos quiméricos o las cadenas de anticuerpos generados en la presente divulgación pueden manipularse, de manera adecuada al nivel de ADN, para generar moléculas con propiedades o estructuras similares a las de los anticuerpos, tal como una región variable humana de una cadena pesada o ligera, ausente una región constante, por ejemplo, un anticuerpo del dominio; o una región variable humana con cualquier región constante de cadena pesada o ligera de la misma o diferente especie; o una región variable humana con una región constante que se produce de forma no natural; o región variable humana junto con cualquier otro participante en la fusión. La divulgación se refiere a todos los derivados de anticuerpos quiméricos derivados de anticuerpos quiméricos identificados de acuerdo con la presente divulgación.

En un aspecto adicional, que no forma parte de la invención, la divulgación se refiere al uso de animales de la presente divulgación en el análisis de los efectos probables de fármacos y vacunas en el contexto de un repertorio de anticuerpos casi humanos.

La divulgación, que no forma parte de la invención, también se refiere a un método para la identificación o validación de un fármaco o una vacuna, comprendiendo el método administrar la vacuna o el fármaco a un mamífero de la divulgación y controlar uno o más de: la respuesta inmunitaria, el perfil de seguridad; el efecto sobre la enfermedad.

La divulgación, que no forma parte de la invención, también se refiere a un kit que comprende un anticuerpo o derivado de anticuerpo tal como se describe en esta memoria e instrucciones para el uso de un anticuerpo de este tipo o un reactivo de laboratorio adecuado, tal como un tampón, reactivo de detección de anticuerpos.

En determinados aspectos, que no forman parte de invención, la divulgación se refiere a:

Un mamífero no humano, cuyo genoma comprende:

(a) la región VDJ de IgH humana aguas arriba de la región constante de mamífero no humano huésped; y

(b) las regiones V y J kappa de la cadena ligera de la Ig humana aguas arriba de la región constante kappa de mamífero no humano huésped y/o las regiones V y J lambda de la cadena ligera de la Ig humana aguas arriba de la región constante lambda de mamífero no humano;

en donde el mamífero no humano es capaz de producir un repertorio de anticuerpos quiméricos que tienen una región constante de mamífero no humano y una región variable humana

y, opcionalmente, en donde el genoma del mamífero no humano se modifica para evitar la expresión de anticuerpos completamente específicos para la especie huésped.

Una célula ES de mamífero no humano, cuyo genoma comprende:

(a) la región V, D y J de IgH humana aguas arriba de una región constante de mamífero no humano; y

(b) las regiones V y J kappa de la cadena ligera de la Ig humana aguas arriba de la región constante kappa de mamífero no humano huésped y/o las regiones V y J lambda de la cadena ligera de la Ig humana aguas arriba de la región constante lambda de mamífero no humano,

en donde la célula ES es capaz de desarrollarse en un mamífero no humano que es capaz de producir un repertorio de anticuerpos que son quiméricos, que tienen una región constante de mamífero no humano y una región variable humana

Un método para producir un mamífero no humano transgénico, capaz de producir un repertorio de anticuerpos quiméricos, teniendo los anticuerpos una región constante de mamífero no humano y una región variable humana, comprendiendo el método insertar mediante recombinación homóloga en un genoma de la célula ES de mamífero no humano

(a) la región VDJ de IgH humana aguas arriba de la región constante de cadena pesada de mamífero no humano huésped y

(b) la región VJ de IgL humana para las cadenas lambda o kappa aguas arriba de la región constante de cadena lambda o kappa de mamífero no humano huésped, respectivamente,

de modo que el mamífero no humano es capaz de producir un repertorio de anticuerpos quiméricos, que tienen una región constante de mamífero no humano y una región variable humana, en donde las etapas (a) y (b) se pueden llevar a cabo de una manera escalonada o como una etapa única.

En un aspecto, la inserción de regiones VDJ o VJ humanas aguas arriba de la región constante del mamífero no humano huésped se logra mediante la inserción escalonada de múltiples fragmentos mediante recombinación homóloga.

En un aspecto, las inserciones escalonadas comienzan en un sitio en el que se ha insertado un casete de iniciación en el genoma de una célula ES que proporciona una región de fijación de objetivo única que consiste en una secuencia de la cadena principal de BAC y un marcador de selección negativa.

En un aspecto, el primer fragmento de la región variable humana se inserta mediante recombinación homóloga en la secuencia de la cadena principal BAC del casete de iniciación y dicho marcador de selección negativa y casete de iniciación se eliminan posteriormente mediante recombinación entre secuencias diana de recombinasa.

En un aspecto, se repiten las inserciones fijadas como objetivo repetidas en la secuencia de iniciación de la cadena principal BAC y la subsiguiente eliminación de la cadena principal por reordenamiento entre las secuencias diana de la recombinasa para construir la región VDJ humana completa aguas arriba de la región constante del no mamífero huésped.

Otros aspectos incluyen:

Un método para producir un anticuerpo específico para un antígeno deseado, comprendiendo el método inmunizar un roedor de acuerdo con la invención con el antígeno deseado y recuperar el anticuerpo o una célula que produce el anticuerpo.

Un método para producir un anticuerpo completamente humanizado que comprende inmunizar a un roedor de la invención y luego reemplazar la región constante del mamífero no humano de un anticuerpo específicamente reactivo con el antígeno con una región constante humana, de manera adecuada mediante modificación del ácido nucleico que codifica el anticuerpo.

Un roedor, que no forma parte de la invención, en donde una secuencia de ADN de la región codificante humana está en una disposición funcional con una secuencia de control de mamífero no humano, de modo que la transcripción del ADN está controlada por la secuencia de control de mamífero no humano. En un aspecto, la región codificante V, D o J humana está en una disposición funcional con una secuencia promotora de ratón.

La divulgación, que no forma parte de la invención, también se refiere a un anticuerpo humanizado producido de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en esta memoria y al uso en medicina de un anticuerpo humanizado así producido.

Se entenderá que realizaciones particulares descritas en esta memoria se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención. Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de experiencia de los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. El uso de la palabra "un" o "una", cuando se utiliza junto con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno"/"una", pero también es consistente con el significado de "uno/una o más, "al menos uno/una" y "uno/una o más de uno/una". El uso del término "o" en las reivindicaciones significa "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere solo a alternativas o las alternativas se excluyen mutuamente, aunque la divulgación apoya una definición que se refiere solo a alternativas e "y/o". A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se utiliza para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, empleándose el método para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos de estudio.

Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y la(s) reivindicación(es), las palabras "que comprende" (y cualquier forma que comprende, tal como "comprenden" y "comprende"), "tener" (y cualquier forma de tener, tal como "tener" y "tiene"), "incluyendo" (y cualquier forma de incluir, tal como "incluye" e "incluyen") o "que contiene" (y cualquier forma de contener, tal como "contiene" y "contienen") son inclusivas o de extremos abiertos y no excluyen elementos adicionales no citados o etapas del método.

La expresión "o combinaciones de los mismos", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos enumerados que preceden a la expresión. Por ejemplo, "A, B, C o combinaciones de los mismos" pretende incluir al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Continuando con este ejemplo, se incluyen expresamente las combinaciones que contengan repeticiones de uno o más elementos o términos, tales como BB, AAA, MB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB , etcétera. El experto en la materia entenderá que típicamente no hay límite en el número de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que resulte evidente de otro modo del contexto.

Cualquier parte de esta divulgación puede leerse en combinación con cualquier otra parte de la divulgación, a menos que resulte evidente de otro modo del contexto.

Todas las composiciones y/o los métodos descritos y reivindicados en esta memoria pueden fabricarse y ejecutarse sin una experimentación excesiva a la vista de la presente divulgación.

La presente divulgación se describe con más detalle en los siguientes Ejemplos no limitantes. El Ejemplo 3 describe datos experimentales que se han obtenido que respaldan la prueba de concepto de determinados aspectos de la divulgación, mientras que los Ejemplos 1 y 2 proporcionan una guía detallada para la persona experta en la técnica para llevar a cabo la divulgación reivindicada.

Ejemplo 1(ejemplo de referencia)

Estrategia global

Se puede lograr un modelo de ratón de la divulgación insertando ~ 960 kb del locus de cadena pesada humana que contiene todas las regiones V, D y J aguas arriba de la región constante de ratón y 473 kb de la región kappa humana aguas arriba de la región constante de ratón. Alternativamente, o en tándem, la región lambda humana se inserta aguas arriba de la región constante de ratón. Esta inserción se logra mediante la fijación de objetivo de genes en células ES utilizando técnicas bien conocidas en la técnica.

La inserción de alta fidelidad de regiones V-D-J intactas en cada uno de los loci en su configuración nativa (de tipo salvaje) se logra adecuadamente mediante la inserción de cromosomas artificiales bacterianos (BACs) humanos en el locus. De manera adecuada, los BACs se recortan de modo que en el locus final no se duplique ni se pierda secuencia alguna en comparación con el original. Un recorte de este tipo se puede llevar a cabo mediante recombinación.

Los BACs humanos relevantes, adecuadamente recortados que cubren estos loci, tienen un tamaño medio de 90 kb.

En un enfoque, el complemento completo de elementos D y J humanos, así como siete u ocho regiones V humanas, están cubiertos por los primeros BACs que se insertan en el esquema de inserción experimental que se describe más adelante. Los primeros BACs a insertar en los loci IgH e IgK pueden contener las siguientes regiones V. IgH :V6-1, VII-1-1, V1-2, VIII-2-1, V1-3, V4-4, V2-5 e IgK: V4-1, V5-2, V7-3, V2-4, V1-5, V1-6, V3-7, V1-8.

De manera adecuada, el comportamiento de cada uno de los loci se evalúa después de la primera inserción de BAC utilizando ratones quiméricos y también después de cada adición de BAC posterior. Véase más adelante para obtener una descripción detallada de este ensayo de comportamiento.

Se requerirán nueve inserciones de BAC adicionales para el locus *IgH* y cinco para *IgK* para proporcionar el complemento completo de regiones V humanas que cubran todos los loci *IgH* e *IgK* de 0,96 Mb y 0,473 Mb, respectivamente.

No todos los BACs conservan su configuración de tipo salvaje cuando se insertan en el genoma de células ES. Por lo tanto, los autores de la invención emplean matrices genómicas de alta densidad para seleccionar células ES e identificar aquellas con inserciones BAC intactas (Barrett, M.T., Scheffer, A., Ben-Dor, A., Sampas, N., Lipson, D., Kincaid, R., Tsang, P., Curry, B., Baird, K., Meltzer, P.S., et al. (2004). Hibridación genómica comparativa utilizando micromatrices de oligonucleótidos y ADN genómico total. Actas de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América 101, 17765-17770.). Esta selección también permite identificar y seleccionar frente a clones de ES en los que el genoma de las células ES está comprometido y, por lo tanto, no es capaz de poblar la línea germinal de animales quiméricos. Otras herramientas genómicas adecuadas para facilitar esta evaluación incluyen la secuenciación y la verificación por PCR.

Por lo tanto, en un aspecto, se confirma la estructura BAC correcta antes de pasar a la siguiente etapa.

Está implícito a partir de la descripción anterior que con el fin de diseñar completamente los loci con BACs de 90 kb, es necesario realizar un mínimo de 10 etapas de fijación de objetivo para *IgH* y 5 etapas para *IgK*. Ratones con un locus IgL pueden generarse de manera similar al locus IgK. Se requieren etapas adicionales para eliminar los marcadores de selección requeridos para respaldar la fijación como objetivo de genes. Dado que estas manipulaciones se realizan en células ES de forma escalonada, en un aspecto, la capacidad de transmisión de la línea germinal se conserva a lo largo de este proceso.

Puede ser importante en la presente invención mantener el comportamiento de los clones de células ES a través de múltiples rondas de manipulación sin la necesidad de testar el potencial de la línea germinal de la línea de células ES en cada etapa. Las líneas celulares actualmente en uso para los proyectos de inactivación global KOMP y EUCOMM se modificaron dos veces antes de su uso para este proyecto y sus tasas de transmisión de línea germinal no han cambiado con respecto a las células parentales (estas líneas están disponibles públicamente, véase www.komp.org y www.eucomm.org). Esta línea celular, denominada JM8, puede generar 100 % de ratones derivados de células ES en las condiciones de cultivo publicadas (Pettitt, S.J., Liang, Q., Rairdan, X.Y., Moran, J.L., Prosser, H.M., Beier, D.R., Lloyd, K.C., Bradley, A. y Skarnes, W.C. (2009). Células madre embrionarias Agouti C57BL/6N para fuentes genéticas

de ratón, Nature Methods.). Estas células han demostrado la capacidad de contribuir de forma reproducible al tejido somático y la línea germinal de animales quiméricos utilizando condiciones de cultivo de células ES de ratón estándares. Esta capacidad se puede encontrar con células cultivadas en una línea celular alimentadora estándar (SNL) e incluso sin alimentador, cultivadas solo en placas de cultivo de tejidos recubiertas con gelatina. Una sublínea particular, JM8A3, mantuvo la capacidad de poblar la línea germinal de quimeras después de varias rondas en serie de sub-clonación. Una manipulación genética extensiva vía, por ejemplo, recombinación homóloga - como sería el caso en la presente invención - no puede comprometer la pluripotencialidad de las células. La capacidad de generar quimeras con un porcentaje tan alto de tejido derivado de células ES tiene otras ventajas. En primer lugar, los altos niveles de quimerismo se correlacionan con el potencial de transmisión de la línea germinal y proporcionan un ensayo sustituto para la transmisión de la línea germinal mientras que solo dura de 5 a 6 semanas. En segundo lugar, dado que estos ratones son 100 % derivados de células ES, los loci modificados pueden testarse directamente, eliminando el retraso provocado por el cultivo. Es posible testar la integridad de los nuevos loci de Ig en la quimera, ya que el embrión huésped derivará de animales que son mutantes para el gen RAG-1 tal como se describe en la siguiente sección.

Otra línea celular que puede utilizarse es una línea celular HPRT-ve, tal como AB2.1, como se describe en "Chromosome engineering in mice", Ramirez-Solis R, Liu P y Bradley A, Nature 1995;378;6558;720-4.

Complementación de RAG-1

Si bien muchos clones generarán ratones 100% derivados de ES, algunos no lo harán. Por lo tanto, en cada etapa se generan ratones en un entorno deficiente en RAG-1. Esto proporciona a los ratones un 100 % de células T Band derivadas de ES que se pueden utilizar directamente para la inmunización y la producción de anticuerpos. Pueden utilizarse células que tienen un antecedente deficiente en RAG-2, o un antecedente deficiente en RAG-1/RAG-2 combinado, o mutaciones equivalentes en las que los ratones producen solo células B y/o células T derivadas de células ES.

Con el fin de que sólo los loci *IgH* o *IgK* de ratón-ser humano estén activos en estos ratones, los loci *IgH* e *IgK* de ratón-ser humano pueden diseñarse en una línea celular en la que un alelo del locus *IgH* o *IgK* ya ha sido inactivado. Alternativamente, la inactivación del locus Ig del huésped, tal como el locus IgH o IgK, puede llevarse a cabo después de la inserción.

Las cepas de ratón que tienen mutado el gen RAG-1 son inmunodeficientes ya que no tienen linfocitos B o T maduros (documento US 5.859.307). Los linfocitos T y B solo se diferencian si se produce una recombinación V(D)J adecuada. Dado que RAG-1 es una enzima que es crucial para esta recombinación, los ratones que carecen de RAG-1 son inmunodeficientes. Si los embriones del huésped son genéticamente mutantes homocigotos RAG-1, una quimera producida mediante la inyección de un embrión de este tipo no será capaz de producir anticuerpos si los tejidos linfoides del animal se derivan del embrión huésped. Sin embargo, las células JM8 y las células AB2.1, por ejemplo, contribuyen generalmente con más del 80% de los tejidos somáticos del animal quimérico y, por lo tanto, habitualmente pueblan el tejido linfoide. Las células JM8 tienen actividad RAG-1 de tipo salvaje y, por lo tanto, los anticuerpos producidos en el animal quimérico serían codificados únicamente por el genoma de la célula JM8 ES modificada. Por lo tanto, el animal quimérico puede desafiarse con un antígeno mediante inmunización y posteriormente producir anticuerpos contra ese antígeno. Esto permite a un experto en la técnica testar el comportamiento de los loci IgH e IgK humanos/de ratón modificados genéticamente como se describe en la presente divulgación. Véanse las Figuras 19 y 20.

Un experto en la técnica utilizaría el animal quimérico como se describe para determinar el alcance de la diversidad de anticuerpos (véase, p. ej., Harlow, E. y Lane, D. 1998, 5ª edición, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY). Por ejemplo, la existencia en el suero del animal quimérico de determinados epítopos de anticuerpos podría comprobarse mediante la unión a antisuero anti-idiotipo específico, por ejemplo, en un ensayo ELISA. Un experto en la técnica también podría secuenciar los genomas de los clones de células B derivados del animal quimérico y comparar dicha secuencia con la secuencia de tipo salvaje para comprobar el nivel de hipermutación, indicando dicha hipermutación la maduración normal del anticuerpo.

Un experto en la técnica también utilizaría dicho animal quimérico para examinar la función del anticuerpo en donde dichos anticuerpos son codificados a partir de los loci de Ig modificados (véase, p. ej., Harlow, E. y Lane, D. 1998, 5ª edición, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY). Por ejemplo, los antisueros podrían testarse para unir un antígeno, utilizándose dicho antígeno para inmunizar al animal quimérico. Una medición de este tipo podría realizarse mediante un ensayo ELISA. Alternativamente, un experto en la técnica podría testar la neutralización del antígeno mediante la adición de los antisueros recogidos del animal quimérico apropiadamente inmunizado.

Es bien conocido por los expertos en la técnica que los resultados positivos de cualquiera de estos tests demuestran la capacidad de los loci de Ig modificados, el objeto de la presente invención, para codificar anticuerpos con regiones variables humanas y regiones constantes de ratón, siendo capaces dichos anticuerpos de funcionar a la manera de los anticuerpos de tipo salvaje.

Técnicas Experimentales

La recombinación para la producción de vectores para uso en la recombinación homóloga en células ES se describe, por ejemplo, en los documentos WO9929837 y WO0104288, y las técnicas son bien conocidas en la técnica. En un aspecto, la recombinación del ADN humano tiene lugar utilizando BACs como fuente de dicho ADN humano. El ADN de BAC humano se aislará utilizando el kit de purificación de BAC de Qiagen. La cadena principal de cada uno de los BACs humanos se modificará utilizando la recombinación a la misma o similar configuración exacta que el BAC ya insertado en la región de la IgH de ratón. La inserción genómica de cada uno de los BACs humanos se recortará utilizando la recombinación, de modo que, una vez que se inserten los BACs, se formará una parte contigua sin costuras de la región genómica V(D)J humana en el locus IgH o IgK de ratón. La transfección de ADN de BAC por electroporación y genotipado se realizará de acuerdo con los protocolos estándares (Prosser, H.M., Rzadzinska, A.K., Steel, K.P. y Bradley, A. (2008). Mosaic complementation demonstrates a regulatory role for myosin VIIa in actin dynamics of stereocilia. Molecular and Cellular Biology 28, 1702-1712; Ramirez-Solis, R., Davis, A.C. y Bradley, A. (1993). Gene targeting in embryonic stem cells. Methods in Enzymology 225, 855-878.).

La recombinación se realizará utilizando los procedimientos y reactivos desarrollados por los laboratorios de Pentao Liu y Don Court (Chan, W., Costantino, N., Li, R., Lee, S.C., Su, Q., Melvin, D., Court, D.L. y Liu, P. (2007). A recombineering based approach for high-throughput conditional knockout targeting vector construction. Nucleic Acids Research 35, e64).

Estas y otras técnicas para la fijación de objetivo de genes y la recombinación de fragmentos cromosómicos derivados de BAC en un genoma de mamífero no humano, tal como un ratón, se describen, por ejemplo, en http://www.eucomm.org/information/targeting/ y http://www.eucomm.org/information/publications.

El cultivo celular de líneas celulares derivadas de C57BL/6N, tales como las células ES masculinas JM8, seguirá técnicas estándares. Se ha demostrado que las células ES JM8 son competentes para contribuir ampliamente en los tejidos somáticos y en la línea germinal, y se están utilizando para grandes programas de mutagénesis en ratones en el Instituto Sanger, tal como EUCOMM y KOMP (Pettitt, S.J., Liang, Q., Rairdan, X.Y., Moran, J.L., Prosser, H.M., Beier, D.R., Lloyd, K.C., Bradley, A. y Skarnes, W.C. (2009). Células madre embrionarias Agouti C57BL/6N para fuentes genéticas de ratón, Nature Methods.). Células ES JM8 ($1{,}0 \times 10^7$) se someterán a electroporación (500 µF, 230 V; BioRad) con 10 µg de ADN de BAC humano linearizado con I-SceI. Los transfectantes se seleccionarán con Puromicina (3 µg/ml) o G418 (150 µg/ml). La selección comenzará 24 horas (con G418) o 48 horas (con puromicina) después de la electroporación y continuará durante 5 días. 10 µg de ADN de BAC humano linearizado pueden producir hasta 500 colonias de células ES resistentes a puromicina o G418. Las colonias de células ES resistentes a los antibióticos se recogerán en placas de cultivo celular de 96 pocillos para el genotipado para identificar los clones fijados como objetivo.

Una vez que se identifiquen los clones de células ES de ratón fijadas como objetivo, se analizarán mediante hibridación genómica comparativa (CGH, por sus siglas en inglés) en matriz para determinar la integridad total del genoma (Chung, Y.J., Jonkers, J., Kitson, H., Fiegler, H., Humphray, S., Scott, C., Hunt, S., Yu, Y., Nishijima, I., Velds, A., et al. (2004). Una micromatriz de BAC de ratón de genoma completo con resolución de 1 Mb para el análisis del número de copias de ADN cambia por hibridación genómica comparativa de matrices. Genome research 14, 188-196 y Liang, Q., Conte, N., Skarnes, W.C. y Bradley, A. (2008). Extensive genomic copy number variation in embryonic stem cells. Actas de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América 105, 17453-17456.). Células ES que tienen genomas anormales no contribuyen eficientemente en la línea germinal de los ratones quiméricos. La integridad del BAC se examinará mediante la amplificación por PCR de cada uno de los genes V funcionales conocidos en el BAC. Por ejemplo, en un enfoque, el primer BAC humano elegido para el locus IgH tiene 6 genes V funcionales. Para confirmar la integridad de este BAC en cuanto a la presencia de estos 6 genes IGH V, se diseñarán y utilizarán al menos 14 pares de cebadores de PCR para amplificar por PCR el ADN genómico de las células ES fijadas como objetivo. El tamaño de tipo salvaje humano y la secuencia de estos fragmentos garantizarán que el BAC insertado no se haya reorganizado.

Una CGH más detallada también confirmará la integridad de los BACs insertados. Por ejemplo, un experto en la técnica podría utilizar una plataforma oligo aCGH, desarrollada por Agilent Technologies, Inc. Esta plataforma no solo permite estudiar la variación del número de copias de ADN en todo el genoma a alta resolución (Barrett, M.T., Scheffer, A., Ben-Dor, A., Sampas, N., Lipson, D., Kincaid, R., Tsang, P., Curry, B., Baird, K., Meltzer, P.S., et al. (2004). Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. Actas de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América 101, 17765-17770.), pero permite el examen de una región específica del genoma utilizando matrices diseñadas a medida. En comparación con las técnicas tradicionales de aCGH que se basan en sondas de ADNc o sondas de BAC completas, las sondas de oligonucleótidos 60-meras pueden garantizar una hibridación específica y una alta sensibilidad y precisión necesarias con el fin de detectar las alteraciones cromosómicas diseñadas que han realizado los autores de la invención. Por ejemplo, los oligos diseñados para hibridarse a intervalos regulares a lo largo de toda la longitud del BAC insertado detectarían incluso deleciones, inserciones u otros reordenamientos bastante cortos. Además, esta plataforma proporciona la mayor flexibilidad para diseños de micromatrices personalizados. El ADN genómico de células ES fijadas como objetivo y el ADN genómico

individual humano normal se marcarán por separado con colorantes y se hibridarán con la matriz. Los portaobjetos de matrices se escanearán con un escáner de micromatrices de ADN de Agilent Technologies. Las intensidades de fluorescencia recíprocas del colorante Cy5 y el colorante Cy3 en cada una de las imágenes de la matriz y los valores de relación log2 se extraerán mediante el software Bluefuse (Bluegnome). Los puntos con patrones de fluorescencia inconsistentes ("confianza" < 0,29 o "calidad" = 0) se excluirán antes de normalizar todos los valores de relación log2. Dentro de un experimento, la relación Log2 entre -0,29 y +0,29 para la señal de cualquier oligosonda se considera que no cambia el número de copias. El umbral de relación log2 para "Duplicación" suele ser > 0,29999 y para la deleción es < 0,29999.

Una vez que el primer BAC humano se inserta en el locus de IgH de ratón y se confirma que está en su configuración nativa intacta, la cadena principal de BAC flanqueada por FRT se escindirá mediante el uso de recombinasa específica para el sitio Flp. Si la recombinación de FRT catalizada por Flp regular no es lo suficientemente alta, se puede utilizar Flo, una versión mejorada de la recombinasa Flpo que en determinados tests es 3-4 veces más eficiente que la Flp original en células ES. Después de escindir la cadena principal de BAC, las células ES se volverán sensibles a Puromicina (o G418) y resistentes a FIAU (por pérdida del casete TK). Los eventos de escisión se caracterizarán, además, mediante la amplificación por PCR del fragmento de unión utilizando cebadores de ADN genómico humano. Estas células ES sin cadena principal de BAC flanqueadas por FRT se utilizarán para la próxima ronda de inserción de BAC humano y para la inyección de blastocistos.

La fijación como objetivo del genoma de una célula ES para producir un ratón transgénico puede llevarse a cabo utilizando un protocolo como se explica con referencia a las Figuras 1-18 adjuntas.

La Figura 1 ilustra tres vectores de la cadena principal básicos; un casete de iniciación y 2 vectores de inserción grandes 1 y 2, respectivamente. El casete de iniciación comprende secuencias homólogas al sitio de inserción deseado en el genoma del ratón, sitios que flanquean un marcador seleccionable y una secuencia de cebador del fragmento de relleno para el genotipado basado en PCR para confirmar la inserción correcta de BACs. La secuencia de cebador del fragmento de relleno proporciona la base para genotipar cada una de las etapas de adición de BAC. Se considera que esta secuencia proporciona un molde de secuencia robusta y bien validada para el cebador de PCR y puede ubicarse en el sitio IScel, idealmente a ~1 kb de la inserción BAC.

Los vectores de inserción grandes comprenden ADN humano en plásmidos con marcadores seleccionables y un sitio de restricción único para la linearización del plásmido para ayudar en la recombinación homóloga en el genoma de la célula ES.

La Figura 2 ilustra la inserción de un casete iniciador en el genoma del ratón mediante recombinación homóloga entre los exones J4 y C alfa del ratón. La selección de puromicina permite la identificación de células ES con la inserción del casete. pu(Delta)tk es una proteína de fusión bifuncional entre la puromicina N-acetiltransferasa (Puro) y una versión truncada de la timidina quinasa del virus del herpes simple tipo 1 (DeltaTk). Las células madre embrionarias (ES) murinas transfectadas con pu(Delta)tk se vuelven resistentes a la puromicina y sensibles a 1-(-2-desoxi-2-fluoro-1-beta-D-arabino-furanosil)-5-yodouracilo (FIAU). A diferencia de otros transgenes HSV1 tk, puDeltatk se transmite fácilmente a través de la línea germinal masculina. Por lo tanto, pu(Delta)tk es un marcador seleccionable positivo/negativo conveniente que puede utilizarse ampliamente en muchas aplicaciones de células ES.

La Figura 3 ilustra la fijación como objetivo del vector de inserción grande 1 al genoma de células ES de ratón. La linearización del vector se realiza en la misma posición que la secuencia del cebador del fragmento de relleno que permite una estrategia de genotipado de reparación de huecos, bien conocida en la técnica - véase Zheng et al NAR 1999, Vol 27, 11, 2354 - 2360. En esencia, la inserción aleatoria del vector de fijación de objetivo en el genoma no 'reparará' el hueco, mientras que un evento de recombinación homóloga reparará el hueco. La yuxtaposición de las secuencias de cebadores de PCR adecuadas permite seleccionar las colonias individualmente en busca de un fragmento de PCR positivo que indique una inserción adecuada. La selección positiva utilizando G418 permite la identificación de células ES de ratón que contienen el marcador de selección neo. La verificación por PCR se puede realizar en todas las regiones V, D y J críticas. La hibridación genómica comparativa de matriz se puede utilizar para validar la estructura del BAC.

La Figura 4 ilustra el casete *puro-delta-tk* y la cadena principal del plásmido BAC se elimina utilizando Flpe y selecciona en FIAU. Dado que Flpe funciona de manera ineficaz en células ES de ratón (deleción del 5 % con expresión transitoria de Flpe), se espera que, en la mayoría de los casos, la recombinación se produzca entre los dos sitios FRT que flanquean la cadena principal de BAC. Flpo también se puede testar para averiguar la eficiencia de recombinación entre dos sitios FRT que están a 10 kb de distancia.

Dado que la etapa de deleción de FRT es seleccionable, es posible agrupar clones resistentes a FIAU y pasar inmediatamente a la siguiente etapa en paralelo con el análisis clonal. Alternativamente, puede ser deseable mostrar mediante PCR de corto alcance que las secuencias humanas ahora son adyacentes a las del ratón como se muestra (cebador Hu 1 y cebador Mo).

En esta fase se habrá insertado un locus humano de 200 kb.

La Figura 5 ilustra que un segundo vector de inserción grande se fija como objetivo al cromosoma de la célula ES. El BAC humano se fija como objetivo al locus de IgH de ratón utilizando la misma inserción del casete de iniciación seguida de la linearización de BAC de *ISce1*, fijando BAC como objetivo el casete de iniciación y la estrategia de genotipado de reparación de huecos. La verificación de la inserción de BAC se lleva a cabo como antes.

La Figura 6 ilustra que la cadena principal de BAC flanqueada por FRTY del vector de inserción grande 2 y el marcador neo se eliminan a través de *Flpo.* Obsérvese que esto no es seleccionable, por lo que será necesario para el análisis clonal en este punto. Esto permitirá la confirmación de la yuxtaposición de la inserción humana 2 con la humana 1 y otros esfuerzos de validación.

En esta fase se habrá insertado un locus humano de ~ 200 kb.

La Figura 7 ilustra el siguiente vector de inserción grande fijado como objetivo al locus de IgH de ratón. Luego se elimina el casete pu-delta TK, como se muestra en la Figura 4. El proceso se puede repetir para incorporar otros BACs.

La Figura 8 ilustra la construcción de células ES predicha final.

Las Figuras 9-18 proporcionan un nivel de detalle adicional de este proceso.

Ejemplo 2 (ejemplo de referencia)

En un método adicional de la divulgación, también se puede emplear la recombinación específica del sitio. La recombinación específica del sitio (SSR, por sus siglas en inglés) se ha utilizado ampliamente en los últimos 20 años para la integración de transgenes en loci cromosómicos definidos. La SSR implica la recombinación entre secuencias de ADN homólogas.

La primera generación de fijación de objetivo cromosómico basado en la SSR implicó la recombinación entre (i) un solo sitio diana de recombinación (RT, por sus siglas en inglés) tal como loxP o FRT en un plásmido transfectado con (ii) un sitio RT cromosómico proporcionado por una integración previa. Un problema importante con este enfoque es que los eventos de inserción son raros, ya que la escisión siempre es más eficiente que la inserción. Una segunda generación de SSR denominada RMCE (siglas inglesas de intercambio de casete mediado por recombinasa) fue introducida por Schlake y Bode en 1994 (Schlake, T.; J. Bode (1994). "Use of mutated FLP-recognition-target-(FRT-)sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci". Biochemistry 33: 12746-12751). Su método se basa en el uso de dos RTs heteroespecíficas e incompatibles en el plásmido transfectado que pueden recombinarse con sitios RT compatibles en el cromosoma, lo que da como resultado el intercambio de un trozo de ADN por otro - o un intercambio de casete. Este enfoque se ha explotado con éxito en una diversidad de fijación de objetivos cromosómicos eficientes, incluyendo la integración de inserciones de BAC de más de 50 kb (Wallace, H.A.C. et al. (2007). "Manipulating the mouse genome to engineering precise functional syntenic replacements with human sequence". Cell 128: 197-209; Prosser, H.M. et al. (2008). "Mosaic complementation demonstrates a regulatory role for myosin VIIa in actin dynamics of Stereocilia". Mol. Cell. Biol. 28: 1702-12).

El tamaño de inserción más grande de un BAC es de aproximadamente 300 kb y, por lo tanto, establece un límite superior en el tamaño del casete para RMCE.

En la presente divulgación, los autores de la misma utilizan una nueva técnica basada en SSR denominada RMCE secuencial (SRMCE, por sus siglas en inglés), que permite la inserción continua de inserciones de BAC en el mismo locus.

El método comprende las etapas de

1 inserción de ADN que forma un casete de iniciación (también denominado plataforma de aterrizaje en esta memoria) en el genoma de una célula;

2 inserción de un primer fragmento de ADN en el casete de iniciación, comprendiendo el primer fragmento de ADN una primera porción de un ADN humano y una primera porción de vector que contiene un primer marcador seleccionable o genera un marcador seleccionable tras la inserción;

3 eliminación de parte del ADN del vector;

4 inserción de un segundo fragmento de ADN en la porción de vector del primer fragmento de ADN, conteniendo el segundo fragmento de ADN una segunda porción de ADN humano y una segunda porción de vector, conteniendo la segunda porción de vector un segundo marcador seleccionable, o generando un segundo marcador seleccionable tras la inserción;

5 eliminación de cualquier ADN del vector para permitir que el primer y el segundo fragmento de ADN humano formen una secuencia contigua; y

6 repetición de las etapas de inserción de ADN de V(D)J humano y eliminación de ADN de vector, según sea necesario, para producir una célula con todo o parte de la región VDJ o VJ humana, suficiente para ser capaz de generar un anticuerpo quimérico en unión con una región constante de huésped,

en donde la inserción de al menos un fragmento de ADN utiliza recombinación específica del sitio.

En un aspecto específico, el enfoque utiliza tres sitios loxP heteroespecíficos e incompatibles. El método consta de las siguientes etapas, y se ilustra en las Figuras 22 - 26:

1.Fijar como objetivo una plataforma de aterrizaje en el lugar definido. Un vector de entrada que contiene un mini-gen HPRT flanqueado por ITRs piggyBac (PB) invertidas se fija como objetivo en una región definida (por ejemplo: una región entre IGHJ y Eμ o IGKJ y Eκ o IGLC1 y Eλ3-1) para servir como plataforma de aterrizaje para la fijación como objetivo de BAC. El mini-gen HPRT está compuesto por dos exones sintéticos y un intrón asociado. El exón 5' HPRT está flanqueado por dos sitios loxP heteroespecíficos e incompatibles (uno de tipo salvaje y el otro un sitio mutado, lox5171) en orientación invertida entre sí (Fig. 22). Estos dos sitios loxP proporcionan sitios de recombinación para la inserción de BAC a través de RMCE.

2.Inserción del 1er BAC modificado en la plataforma de aterrizaje fijada como objetivo. El 1er BAC tiene una longitud de ADN a insertar en el genoma flanqueado por modificaciones diseñadas. La modificación 5' (loxP - gen neo - lox2272 - promotor PGK - PB 5'LTR) y la modificación 3' (PB3'LTR - gen puroΔTK - lox5171) se representa en la Fig. 23 junto con las orientaciones relativas de los sitios lox y PB LTRs. Con la expresión transitoria de CRE de un vector co-electroporado, la secuencia de ADN se insertaría en el locus definido a través de RMCE. Las células en las que se ha producido una inserción correcta se pueden seleccionar de la siguiente manera: (i) resistencia a puromicina (el gen puroΔTK ha adquirido un promotor - "PGK" - de la plataforma de aterrizaje), (ii) resistencia a 6TG (el mini-gen HPRT ha sido interrumpido), y (iii) resistencia a G418 (se selecciona para cualquier inserción a través de la disposición PGK-neo de la región 5'). Puede utilizarse cualquier combinación de estos regímenes de selección. La resistencia G418 y 6TG selecciona los eventos correctos en el extremo 5', mientras que la resistencia puro selecciona los eventos correctos en el extremo 3'.

3.Curado (eliminación) de la modificación 3' de la 1ª inserción. Un 1er BAC correctamente insertado da como resultado que el extremo 3' tenga un gen puroΔTK flanqueado por PB LTRsinvertidas (Fig. 24) - esencialmente una estructura de transposón adecuada. A continuación, este transposón se puede eliminar mediante la expresión transitoria de la transposasa piggyBac (de un vector electroporado). Células con el evento de escisión correcto pueden seleccionarse por resistencia a FIAU - es decir, sin actividad de timidina quinasa del gen puroΔTK. Esto elimina por completo la modificación 3' sin dejar trazas de nucleótidos.

4.Inserción de un 2º BAC modificado en el extremo 5' de la 1ª inserción. El 2º BAC tiene una longitud de ADN a insertar en el genoma (habitualmente destinado a ser contiguo al ADN insertado con el 1er BAC) flanqueado por modificaciones diseñadas. La modificación 5' (loxP - porción 5' del mini-gen HPRT - lox5171 - promotor PGK - PBS'LTR) y la modificación 3' (PB3'LTR - puroΔTK - lox2272) se representan en la Fig. 25 junto con las orientaciones relativas de los sitios lox y PB LTRs. Con la expresión transitoria de CRE de un vector co-electroporado, la secuencia de ADN se insertaría en el locus definido a través de RMCE. Las células en las que se ha producido una inserción correcta se pueden seleccionar de la siguiente manera: (i) resistencia a HAT (el mini-gen HPRT se reconstituye mediante un evento de inserción correcta, es decir, las estructuras de los exones 5' y 3' se unen), y (ii) resistencia a la puromicina (el gen puroΔTK ha adquirido un promotor - "PGK" - de la plataforma de aterrizaje).

5.Curado (eliminación) de la modificación 3' de la 2ª inserción. Un 2º BAC correctamente insertado da como resultado que el extremo 3' tenga un gen puroΔTK flanqueado por PB LTRs invertidas (Fig. 26) - esencialmente una estructura de transposón adecuada, exactamente análoga a la consecuencia de una inserción con éxito del 1er BAC. Y, por lo tanto, este transposón también puede eliminarse mediante la expresión transitoria de la transposasa piggyBac (de un vector electroporado). Células con el evento de escisión correcto pueden seleccionarse por resistencia a FIAU - es decir, sin actividad de timidina quinasa del gen puroΔTK. Esto elimina por completo la modificación 3' sin dejar trazas de nucleótidos.

6. Después de curar la modificación de 3' de la 2ª inserción de BAC, la plataforma de aterrizaje se vuelve idéntica a la original. Todo este proceso, las etapas 2 a 5, se pueden repetir múltiples veces para crear una gran inserción en el genoma. Cuando se completa, no quedan nucleótidos residuales distintos de la inserción deseada.

Con la inserción de un número impar de BACs en los loci de Ig, las secuencias VDJ o VJ endógenas se pueden inactivar mediante una inversión mediante ingeniería cromosómica de la siguiente manera (véanse las Figuras 27 - 29):

1.Fijar como objetivo un casete "invertido" a una región 5' a una distancia de 10 a 40 megabases del VDJ o VJ endógeno. El vector invertido (PB3'LTR - promotor PGK - porción 5' del mini-gen HPRT - loxP - puroΔTK - promotor CAGGS - PBS'LTR) se representa en la Fig. 27 junto con las orientaciones relativas de los sitios lox y PB LTRs.

2.La expresión transitoria de CRE dará como resultado la recombinación entre el sitio loxP en el casete "invertido" y el sitio loxP en la modificación 5'. Esta modificación de 5' es como se describe en las Etapas 2 y 3 anteriores - esencialmente la modificación que resulta de la inserción de un número impar de BACs, después de que se haya curado la modificación de 3'. Los sitios loxP están invertidos entre sí y, por lo tanto, el evento de recombinación descrito da como resultado una inversión como se muestra en la Fig. 28. Células con la inversión correcta serán resistentes a HAT ya que el mini-gen HPRT se reconstituye mediante una inversión correcta.

3. Una inversión correcta también deja dos estructuras de transposón que flanquean el casete "invertido" y la modificación 5'. Ambos se pueden escindir con la expresión transitoria de la transposasa piggyBAC, sin dejar restos de ninguna de las modificaciones (Fig. 29). Las células con las escisiones correctas se pueden seleccionar de la siguiente manera: (i) resistencia a 6TG (se elimina el mini-gen HPRT) y (ii) resistencia a FIAU (se elimina el gen puroΔTK). Una inversión como se describe en los loci Ig alejaría la región IGH-VDJ o IGK-VJ endógena de la región Eμ o Eκ potenciadora, respectivamente, y conduciría a la inactivación de las regiones IGH-VDJ o IGK-VJ endógenas.

Los métodos de inserción descritos en esta memoria proporcionan adecuadamente uno o más de:

Selección en los extremos 5' y 3' del fragmento de ADN insertado;

Curado eficaz de la modificación 3', preferiblemente mediante escisión de ADN mediada por transposasa;

Inactivación de la actividad endógena de IGH o IGK a través de una inversión; y

Escisión de modificaciones, sin dejar restos de nucleótidos en el cromosoma.

Ejemplo 3 (ejemplo de referencia)

La prueba de concepto del enfoque se describe en la Figura 30. En la Figura 30 se insertó una plataforma de aterrizaje como se muestra en la Figura 22 en el genoma de un ratón mediante recombinación homóloga, seguida de la inserción del plásmido R21 en esa plataforma de aterrizaje a través de la recombinación específica del sitio mediada por cre.

El evento de inserción generó un cierto número de eventos de inserción generales, 360 colonias resistentes a G418, de las cuales ~220 se insertaron en el locus deseado, como lo demuestra la interrupción del minilocus HRPT.

El vector R21 imita al 1er vector de inserción BAC en los extremos 5' y 3', incluyendo todos los elementos de selección y los sitios diana de la recombinasa. En lugar de secuencias BAC, hay una pequeña secuencia de 'fragmento de relleno'. Este vector testará todos los principios diseñados en la divulgación y permitirá testar fácilmente los resultados porque la PCR a través del fragmento de relleno es factible y, por lo tanto, permite testar fácilmente ambos extremos de la inserción. R21 se sometió a electroporación conjunta con un vector que expresa cre en las células ES que albergan la plataforma de aterrizaje en el locus IGH. Cuatro conjuntos de células transformadas se transfectaron en paralelo y luego se colocaron bajo diferentes regímenes de selección como se indica en la Figura 30. La selección G418 (expresión del gen neo) dio como resultado el mayor número de colonias debido a que no hubo requisitos para la integración específica de la plataforma de aterrizaje. Cualquier integración de R21 en el genoma proporcionará la expresión neo que conduce a la resistencia a G418. La selección de Puro dio como resultado un número de colonias similar al de Puro + 6TG o G418 + 6TG, lo que sugiere que la rigurosidad de la selección de Puro se debe a que PuroΔTK carece de un promotor en el vector. La expresión de Puro solo se adquiere cuando se produce una integración cerca de un elemento promotor - en este diseño, lo más probable es que sea específicamente en la plataforma de aterrizaje. Estas conclusiones están respaldadas por los resultados de la unión PCR que se muestra en la Figura 31.

La siguiente etapa en la divulgación es 'curar' el extremo 3' del vector BAC integrado, dejando una transición sin costuras entre la inserción y el genoma flanqueante. Los autores de la invención demostraron este curado expandiendo un clon individual desde arriba (R21 insertado en la plataforma de aterrizaje) y expresando la recombinasa piggyBac en este clon mediante la transfección de un plásmido de expresión. Se utilizó FIAU para seleccionar colonias en las que se escindió la modificación 3' - es decir, a través de la pérdida del elemento 'PGK-puroΔTK' entre las repeticiones terminales piggyBac. Cincuenta clones de este tipo resultaron de una transfección de

10^6 células; de estos, los autores de la invención testaron 6 para la estructura genómica esperada. El curado con éxito dio como resultado una PCR positiva entre el conjunto de cebadores marcado como "3" en la Figura 32. De los 6 clones, 4 tenían escisiones correctas, 1 clon permaneció en la configuración original y 1 otro tenía una deleción.

Estos datos demuestran la inserción iterativa de ADN en una plataforma de aterrizaje en un locus genómico definido utilizando los enfoques arriba descritos.

Ejemplo 4 (ejemplo de referencia)

El Ejemplo 3 demostró que el diseño de la divulgación reivindicada era capaz de proporcionar la inserción de un vector de ensayo en el genoma en una ubicación definida, en este caso el vector R21 en el locus IGH de ratón. El uso de los medios de selección apropiados y la expresión de cre-recombinasa dieron como resultado una alteración genómica con la estructura predicha.

Los mismos elementos de diseño descritos en esta divulgación se incorporaron en los extremos 5' y 3' de una inserción BAC. Dicha inserción comprendía secuencias humanas del locus IGH y tenía aproximadamente 166 kb. Este BAC diseñado se sometió a electroporación junto con un ADN de plásmido que expresa cre en células ES de ratón que albergan la plataforma de aterrizaje en el locus IGH de ratón. La población de células transfectadas se cultivó en medios que contenían puro para seleccionar los eventos de inserción apropiados.

Siete clones resultantes se aislaron y analizaron adicionalmente. El evento de recombinación esperado y la estructura resultante se representan en la Figura 33. Basado en los datos del experimento R21 esbozado en el Ejemplo 3, se esperaba una selección rigurosa para los clones correctos cuando la población transfectada se seleccionó en medios que contenían puro. Esto se debe a que la región codificante de puro requiere un elemento promotor y este lo proporciona preferentemente la plataforma de aterrizaje después de la recombinación. Por consiguiente, la mayoría de los 7 clones aislados se habían insertado correctamente en el genoma en la plataforma de aterrizaje según se determina mediante la PCR de diagnóstico. Los cebadores para diagnosticar una inserción correcta se representan en la Figura 33. Las uniones correctas están presentes en el genoma si se amplifica un fragmento de 610 pb entre los cebadores 'A' y 'X' y un fragmento de 478 pb entre los cebadores 'Y' y 'B' (Figuras 33 y 34). Obsérvese que existen fragmentos amplificados entre los cebadores 'A' y '1' y los cebadores '2' y 'B' que indican la presencia del genoma parental (es decir, la plataforma de aterrizaje sola). Estos resultan de células parentales presentes internamente en las colonias de células bajo selección de puro que escapan a la selección debido a la geometría de una colonia. Después de pasar la colonia a través de medios que contienen puro, estos fragmentos de unión parental desaparecen, lo que indica que las células parentales se eliminan de la población. Además, se demostró que todos los clones eran resistentes a 6-TG como se esperaba si el gen HPRT se inactiva por el evento de inserción correcto.

Estos datos indican que la estrategia descrita para insertar grandes partes de los loci IG humanos en posiciones definidas en el genoma del ratón permitirá la construcción de un ratón con una pluralidad de regiones variables de las regiones IG humanas aguas arriba de las regiones constantes del ratón como se describe.

REIVINDICACIONES

1.Un método para la inserción de parte de o una región VDJ humana completa, comprendiendo el método la inserción de tres o más fragmentos de ADN humano en una diana de ADN de célula ES de roedor comprendida por un locus IgH de roedor en una célula ES de roedor,

en el que la inserción es de fragmentos de ADN de > 100 kb en un cromosoma de la célula ES de roedor de una manera escalonada,
en el que los fragmentos del locus VDJ humano se insertan aguas arriba de la región constante de la cadena pesada de roedor mediante recombinación homóloga,
en el que el método comprende la inserción de una primera secuencia de ADN en la diana, teniendo la secuencia una porción de vector de ADN y una primera secuencia de interés (X1);
inserción de una segunda secuencia de ADN en la porción de vector de la primera secuencia, teniendo la segunda secuencia de ADN una segunda secuencia de interés (X2) y una segunda porción de vector,
escindiendo cualquier ADN de la secuencia de vector separando X1 y X2 mediante transposasa PiggyBac, mediada por la escisión de ADN,
proporcionando con ello una secuencia X2X1 contigua dentro de la diana, en donde X1 y X2 están unidas juntas directamente sin secuencias intermedias,
inserción de una o más secuencias de ADN adicionales, teniendo cada una de las secuencias de ADN adicionales una secuencia de interés adicional y una porción de vector adicional,
en donde la inserción se realiza en la porción de vector de la secuencia de ADN precedente en la diana para configurar un fragmento de ADN humano contiguo en la diana,
en donde X1, X2 y secuencias de interés adicionales son ADN humano y comprenden fragmentos del locus VDJ humano.

2. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que un fragmento de ADN insertado comprende una parte de la región VDJ humana flanqueada por secuencias 5' o 3' que no son de la región VDJ humana, en donde las secuencias 5' o 3' flanqueantes contienen cada una uno o más marcadores seleccionables.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la inserción de ADN de VDJ humano en un genoma se consigue sin dejar algo de dicho ADN flanqueante en el genoma, siendo eliminado el ADN flanqueante mediante escisión mediada por la transposasa PiggyBac.

4. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la región VDJ humana se configura de una manera escalonada utilizando 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 o más inserciones separadas.

5. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que 800-1000 kb de la región VDJ de IgH humana se inserta en el locus IgH de ratón.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la región IgH insertada comprende bases 105.400.051 a 106.368.585 del cromosoma 14 humano (NCBI36 para el genoma humano, Versión 54 de ENSEMBL).

7. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el método es para la inserción en una diana de ADN de una célula ES de ratón, y el extremo 3' del último gen J humano a insertar tiene menos de 2 kb, opcionalmente menos de 1 kb de la región de unión ser humano-ratón.

8. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el método produce una célula que comprende ADN de VDJ humano insertado, y la célula es una célula ES de roedor que se puede utilizar para generar un roedor que es un recombinante homocigoto para la inserción deseada.

9. Un método para producir un roedor transgénico, comprendiendo el método la inserción de múltiples fragmentos de ADN en una diana genómica de ADN de una célula ES de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

10. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el genoma del roedor se modifica para prevenir la expresión en el roedor de los anticuerpos de roedor nativos mediante inactivación de una parte del locus Ig del roedor, en el que dicha modificación se consigue mediante inserción de uno o más sitios de recombinasa específicos en el genoma y luego el uso de estos sitios en la escisión mediada por recombinasa de una parte del locus Ig del roedor.

11. Un método para producir un anticuerpo específico para el antígeno, que comprende llevar a cabo el método de acuerdo con la reivindicación 10 y llevar a cabo la etapa adicional de inmunizar el roedor transgénico con un antígeno deseado y recuperar el anticuerpo específico para el antígeno, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico que tiene una región constante del roedor y una región variable humana.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende, además, la etapa de reemplazar la región constante del roedor por una región constante humana.

13. El método de la reivindicación 11, en el que el roedor transgénico produce anticuerpos quiméricos que tienen una región constante del roedor y una región variable humana, y los anticuerpos quiméricos se manipulan, opcionalmenteal nivel de ADN, para generar moléculas con propiedades o estructura tipo anticuerpo, seleccionadas de:

una región variable humana de una cadena pesada o ligera, ausente una región constante, por ejemplo, un anticuerpo del dominio; o
una región variable humana con cualquier región constante de cadena pesada o ligera de la misma o diferente especie;
una región variable humana con una región constante que se produce de forma no natural; o
región variable humana junto con cualquier otro participante en la fusión.

14. Un método para producir una composición farmacéutica, que comprende llevar a cabo el método de una cualquiera de las reivindicaciones 11-13 y llevar a cabo la etapa adicional de combinar el anticuerpo con un soporte farmacéuticamente aceptable u otro excipiente para producir la composición.

15. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, 6 y 8-14, en el que el roedor es un ratón.

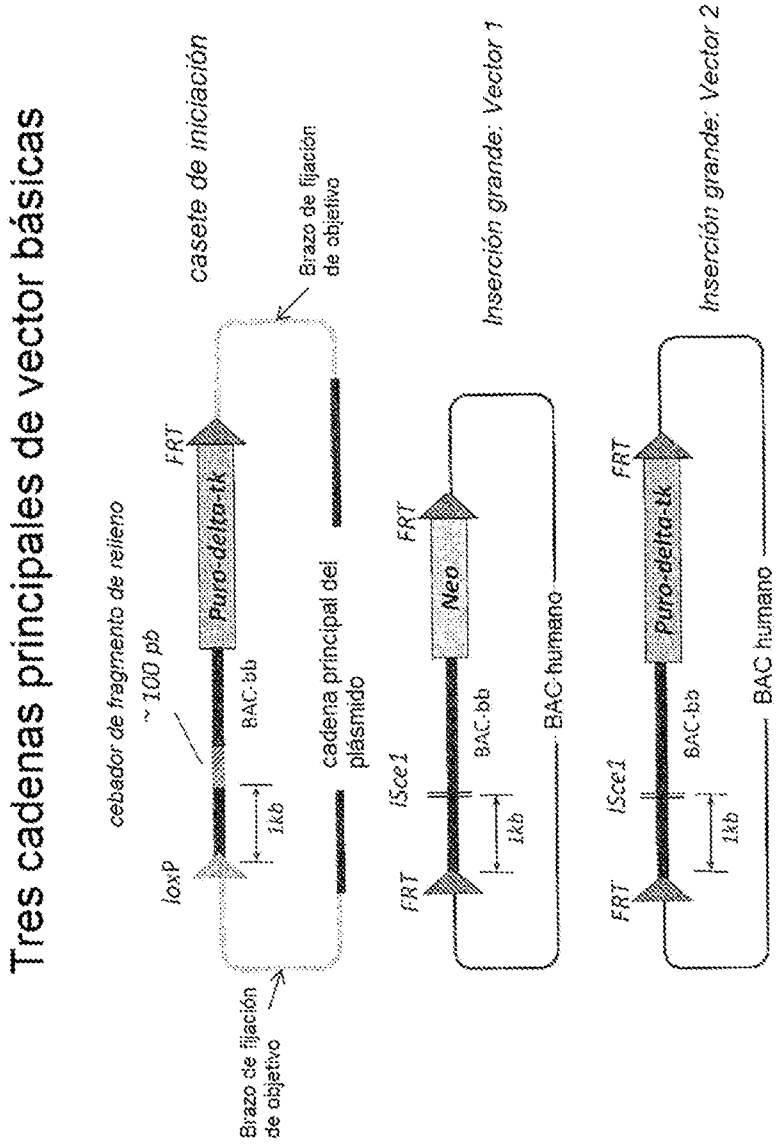

Tres cadenas principales de vector básicas
casete de iniciación
Brazo de fijación de objetivo
FRT
Puro-delta-tk
cebador de fragmento de relleno
~ 100 pb
BAC-bb
cadena principal del plásmido
loxP
1kb
Brazo de fijación de objetivo
Inserción grande: Vector 1
FRT
Neo
ISce1
BAC-bb
BAC humano
FRT
1kb
Inserción grande: Vector 2
FRT
Puro-delta-tk
ISce1
BAC-bb
BAC humano
FRT
1kb

Fig. 1

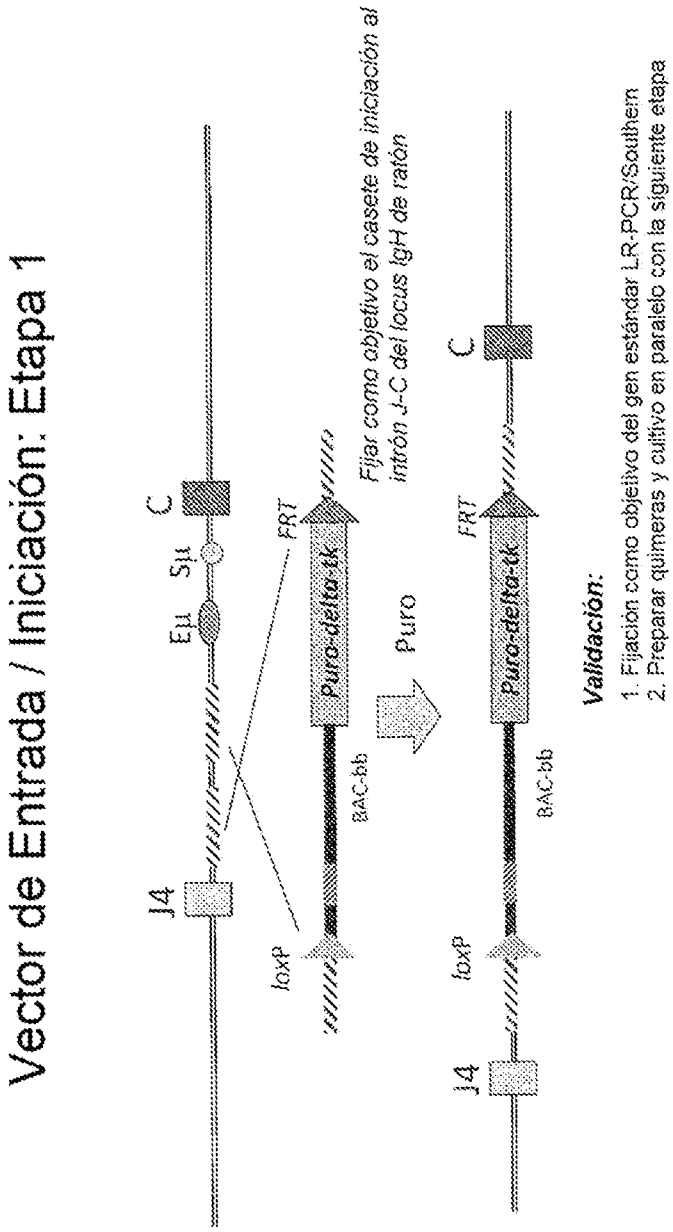

Vector de Entrada / Iniciación: Etapa 1
J4
Eμ
Sμ
C
loxP
FRT
Puro-delta-tk
BAC-bb
Fijar como objetivo el casete de iniciación al intrón J-C del locus IgH de ratón
Puro
J4
loxP
FRT
Puro-delta-tk
BAC-bb
C
Validación:
1. Fijación como objetivo del gen estándar LR-PCR/Southern
2. Preparar quimeras y cultivo en paralelo con la siguiente etapa

Fig. 2

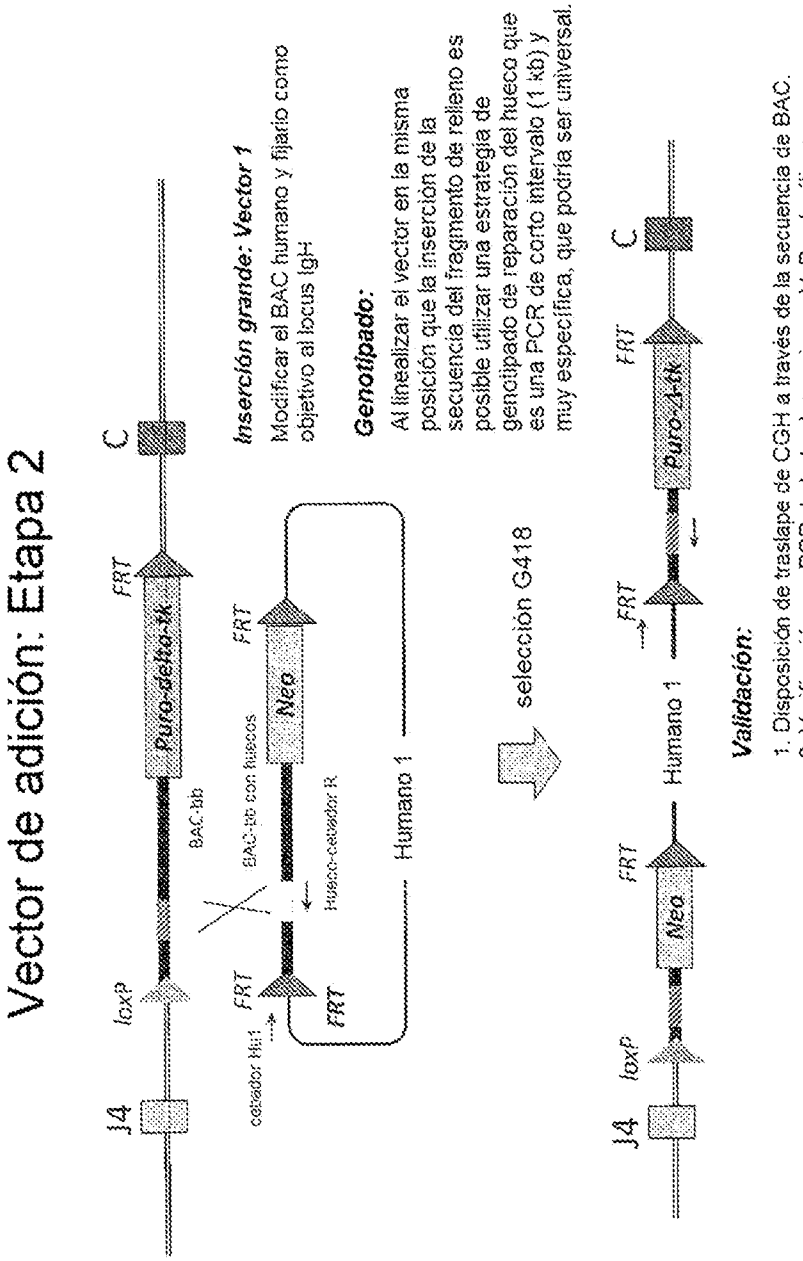

Vector de adición: Etapa 2
J4
loxP
FRT
Puro-delta-TK
C
BAC-bb
cebador Hin1
FRT
FRT
BAC-bb con huecos
Neo
FRT
Hueco-cebador R
Humano 1
selección G418
J4
loxP
FRT
Neo
Humano 1
FRT
FRT
Puro-1-tK
C
Inserción grande: Vector 1
Modificar el BAC humano y fijarlo como objetivo al locus IgH
Genotipado:
Al linealizar el vector en la misma posición que la inserción de la secuencia del fragmento de relleno es posible utilizar una estrategia de genotipado de reparación del hueco que es una PCR de corto intervalo (1 kb) y muy específica, que podría ser universal.
Validación:
1. Disposición de traslape de CGH a través de la secuencia de BAC.
2. Verificación por PCR de todas las regiones V, D y J orificas

Fig. 3

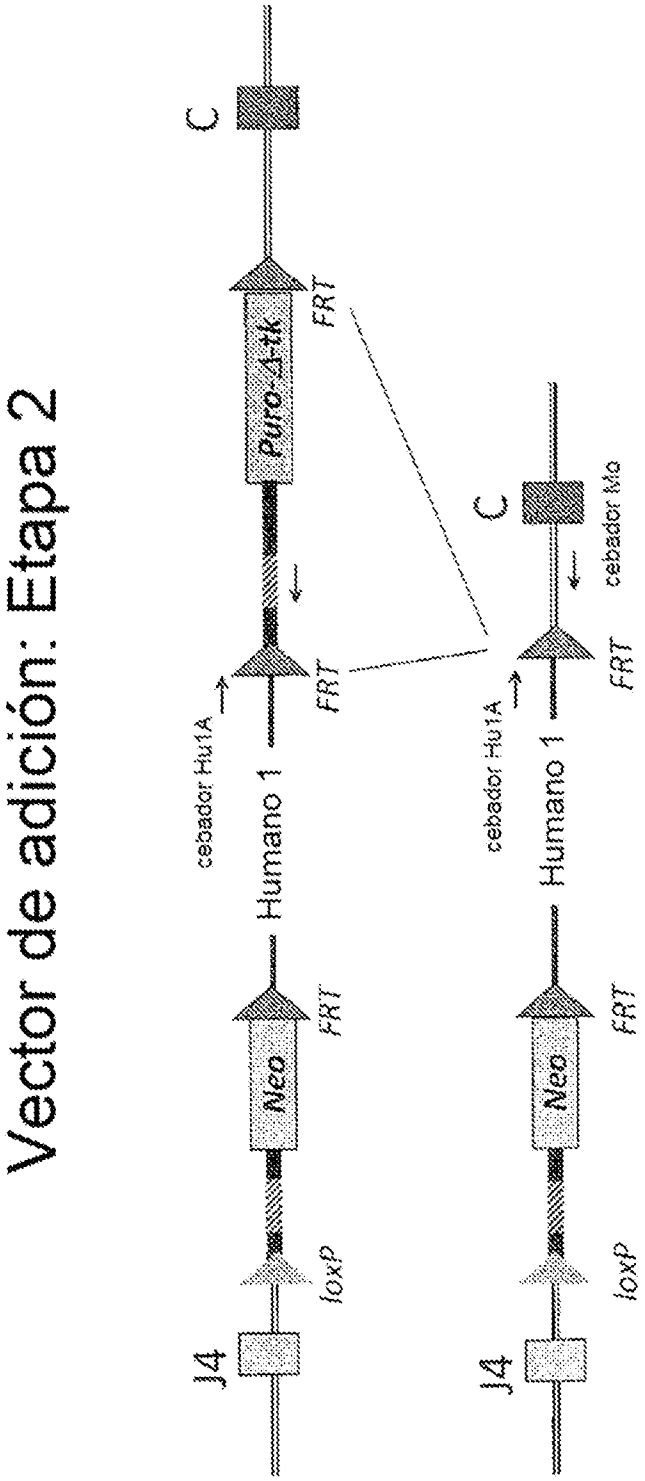
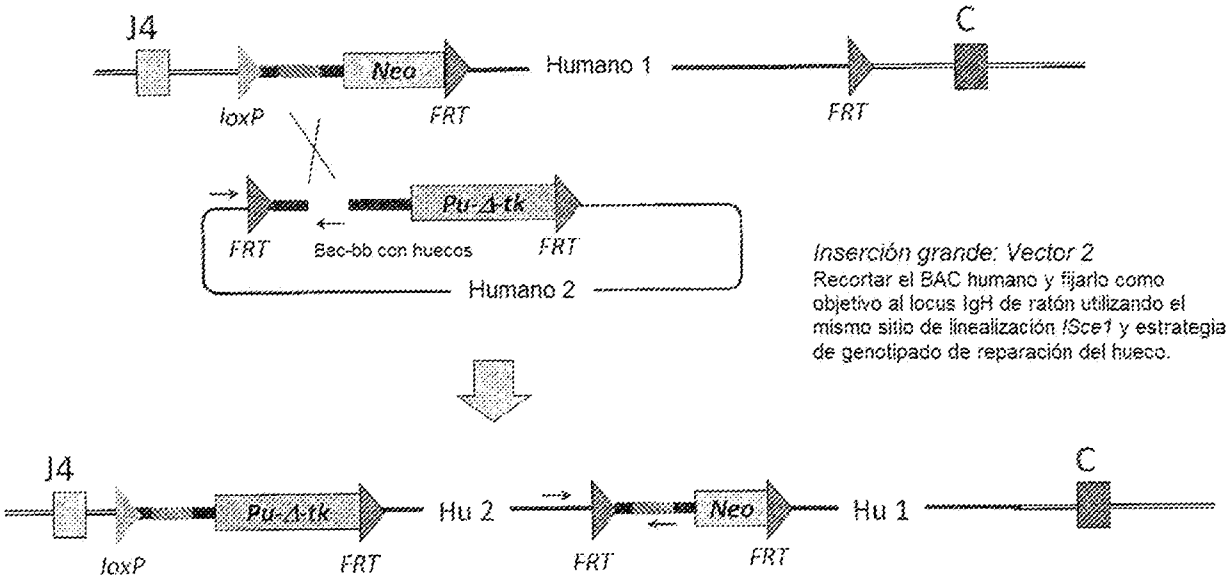

Vector de adición: Etapa 2
J4
loxP
Neo
FRT
Humano 1
cebador Hu1A
FRT
Puro-Δ-tk
FRT
C
J4
loxP
Neo
FRT
Humano 1
cebador Hu1A
FRT
C
cebador Mo

Fig. 4

Vector de adición: Etapa 3A



Validación:

1. Disposición de traslape a través de las secuencias de BAC para Hu1 y Hu2
2. Verificación por PCR de todas las regiones V, D y J críticas

Fig. 5

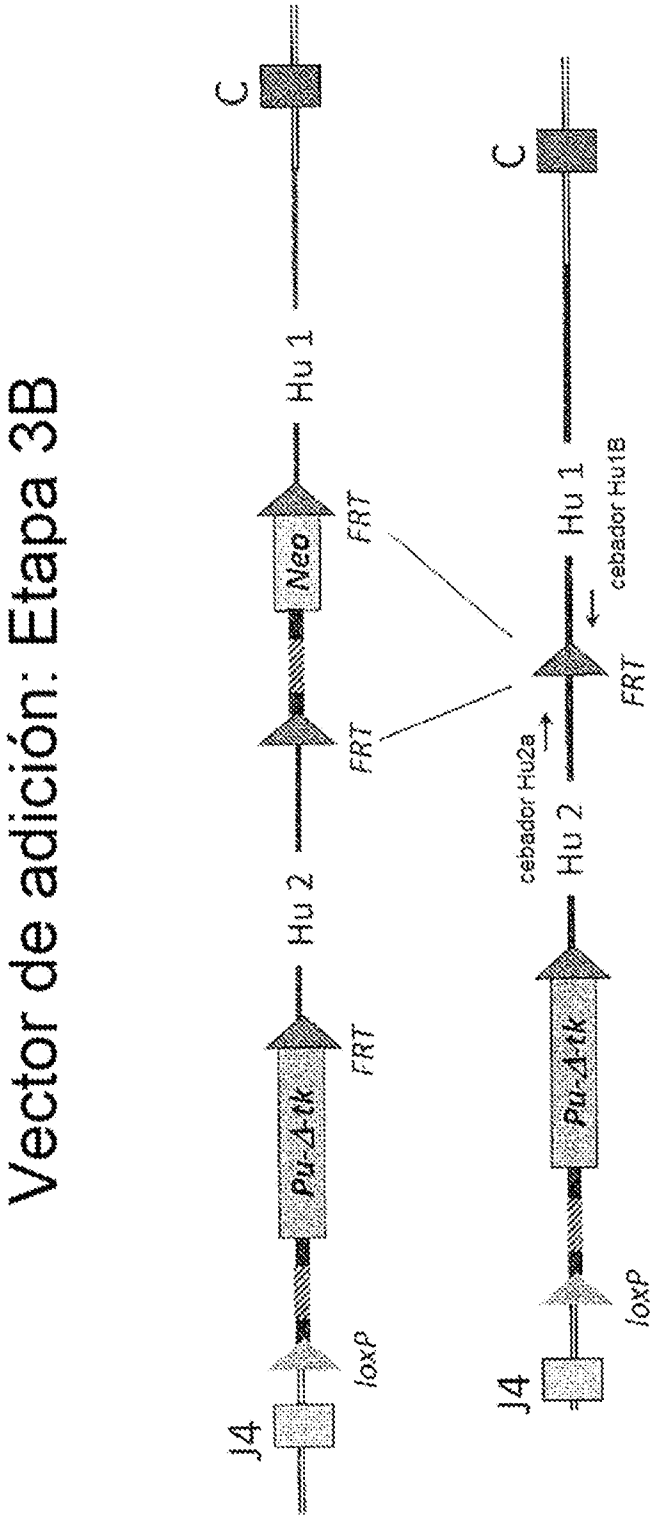

Vector de adición: Etapa 3B
J4
loxP
Pu-Δtk
FRT
Hu 2
FRT
Neo
Hu 1
C
J4
loxP
Pu-Δtk
Hu 2
cebador Hu2a
FRT
Hu 1
cebador Hu1B
C

Fig. 6

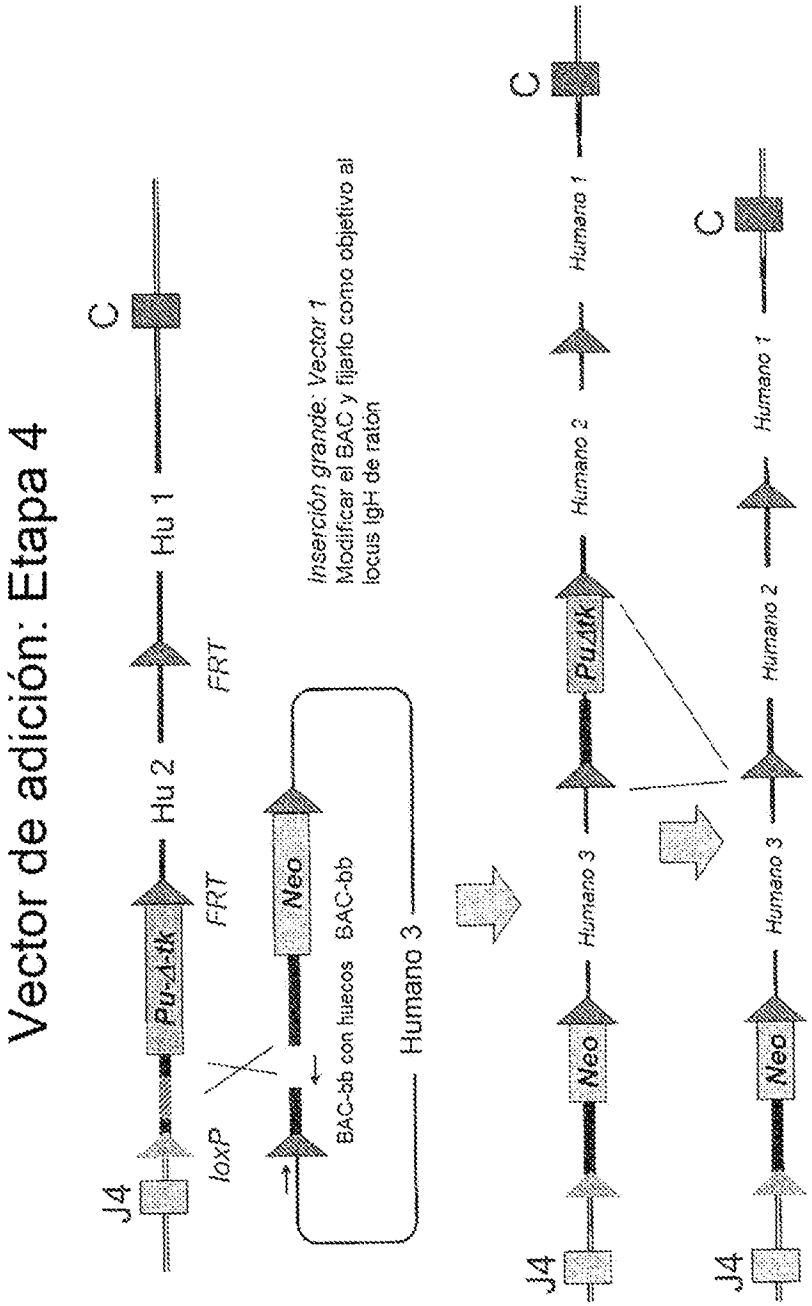

Vector de adición: Etapa 4
J4
loxP
Pu-Δ-tk
FRT
Hu 2
FRT
Hu 1
C
BAC-bb con huecos
Neo
BAC-bb
Humano 3
Inserción grande: Vector 1
Modificar el BAC y fijarlo como objetivo al locus IgH de ratón
J4
Neo
Humano 3
Pu-Δtk
Humano 2
Humano 1
C
J4
Neo
Humano 3
Humano 2
Humano 1
C

Fig. 7

Un locus *IgH* de ratón humanizado

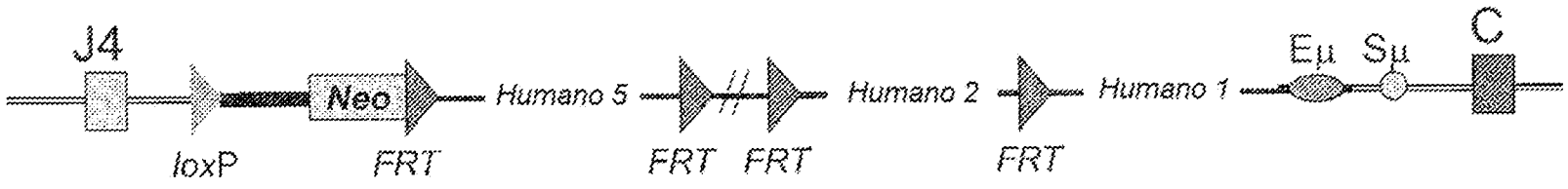


Fig. 8

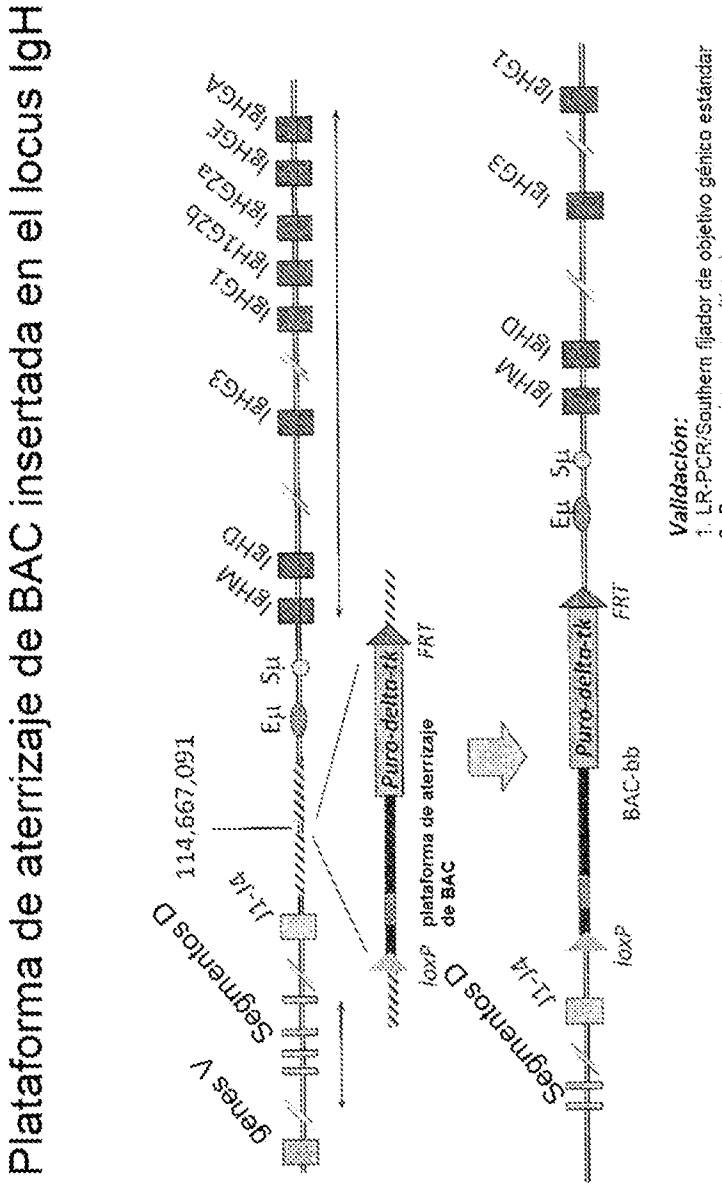

Plataforma de aterrizaje de BAC insertada en el locus IgH
IgHGA
IgHGE
IgHG2a
IgHG2b
IgHG1
IgHG3
IgHD
IgHM
Eμ
Sμ
114.667.091
JH-J4
Segmentos D
genes V
Puro-delta-tk
FRT
loxP
plataforma de aterrizaje de BAC
IgHG1
IgHG3
IgHD
IgHM
Eμ
Sμ
Puro-delta-tk
FRT
BAC-bb
loxP
JH-J4
Segmentos D
Validación:
1. LR-PCR/Southern fijador de objetivo génico estándar
2. Preparar quimeras y cultivo de ensayo

Fig. 9

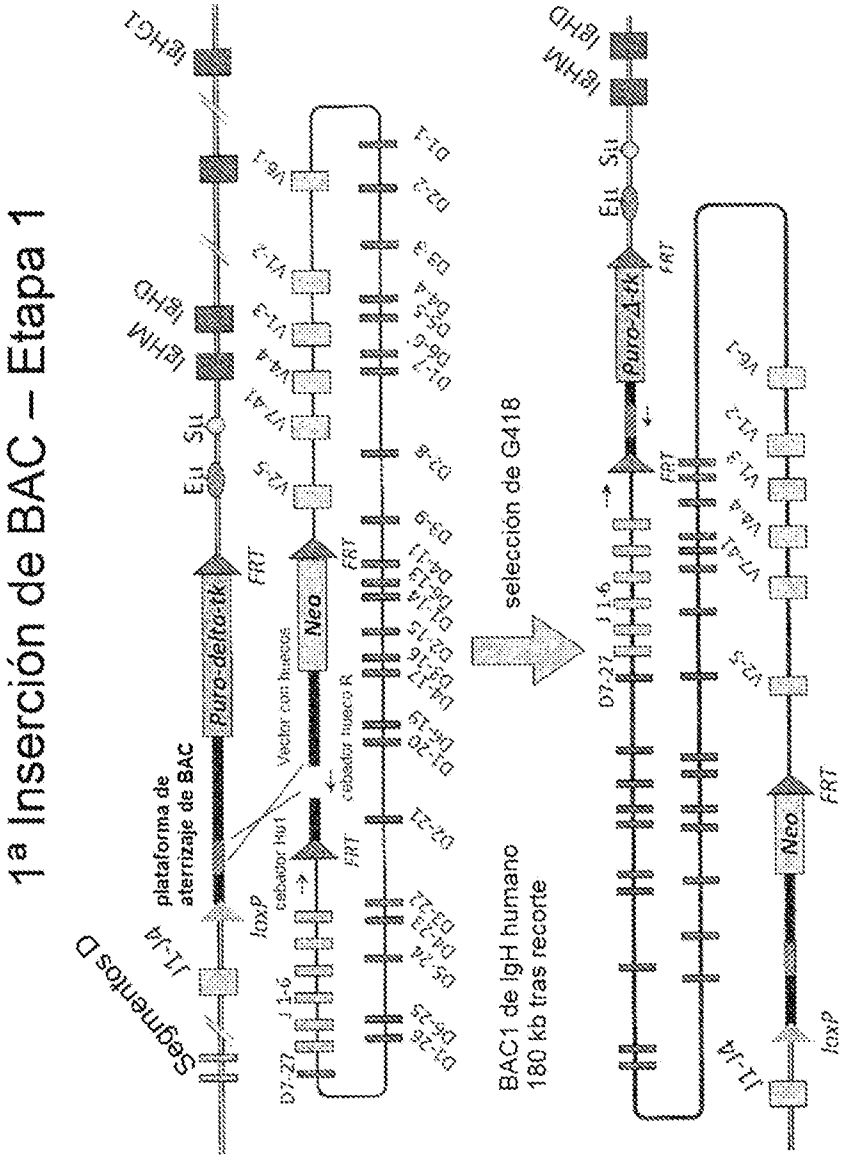

1ª Inserción de BAC – Etapa 1
IgHG1
IgHM
IgHD
Segmentos D
JL-JA
plataforma de aterrizaje de BAC
loxP
Puro-delta-tk
FRT
E1
SIS
Neo
Vector con huecos
cebador hueco R
cebador Hd1
D7-27
J1-6
selección de G418
BAC1 de IgH humano
180 kb tras recorte

Fig. 10

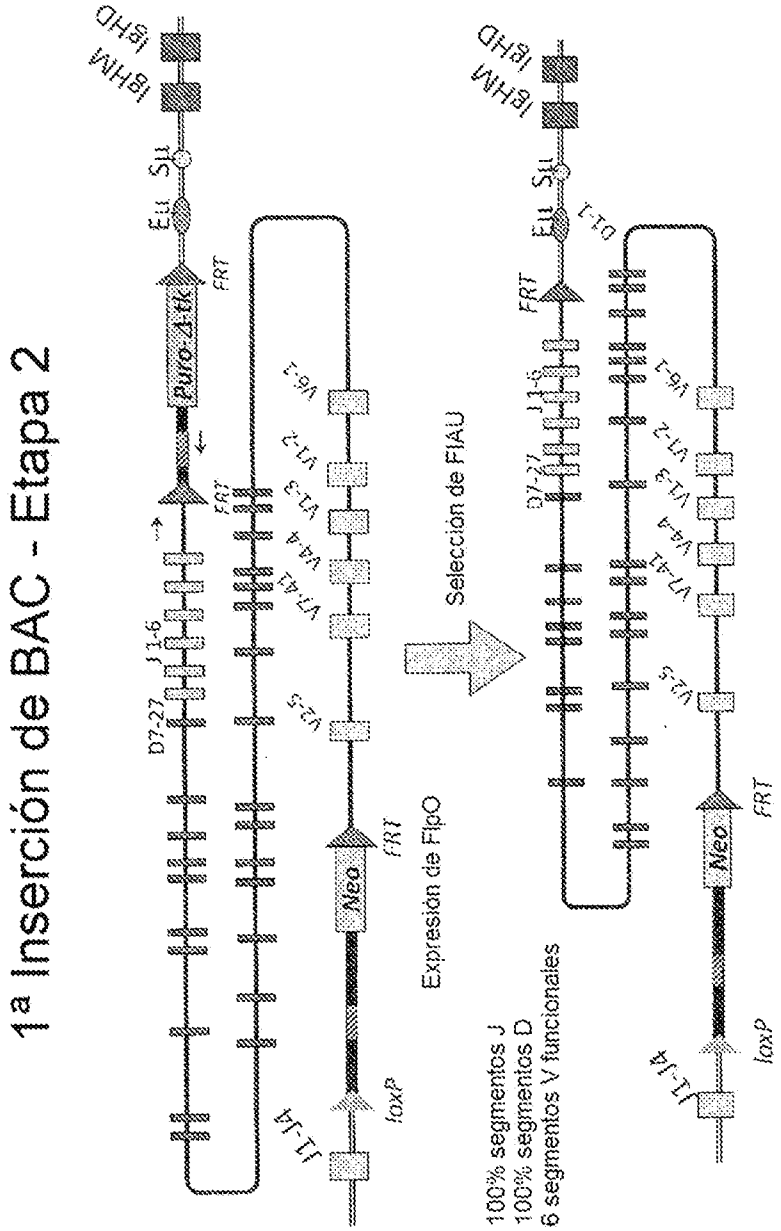

1ª Inserción de BAC - Etapa 2
IgHM
IgHD
Sμ
Eμ
FRT
Puro-TK
D7-27
J1-6
VH-1
VH-2
VH-3
VH-4
VH-41
VH-5
FRT
Neo
FRT
loxP
J1-J4
Selección de FIAU
Expresión de FlpO
100% segmentos J
100% segmentos D
6 segmentos V funcionales

Fig. 11

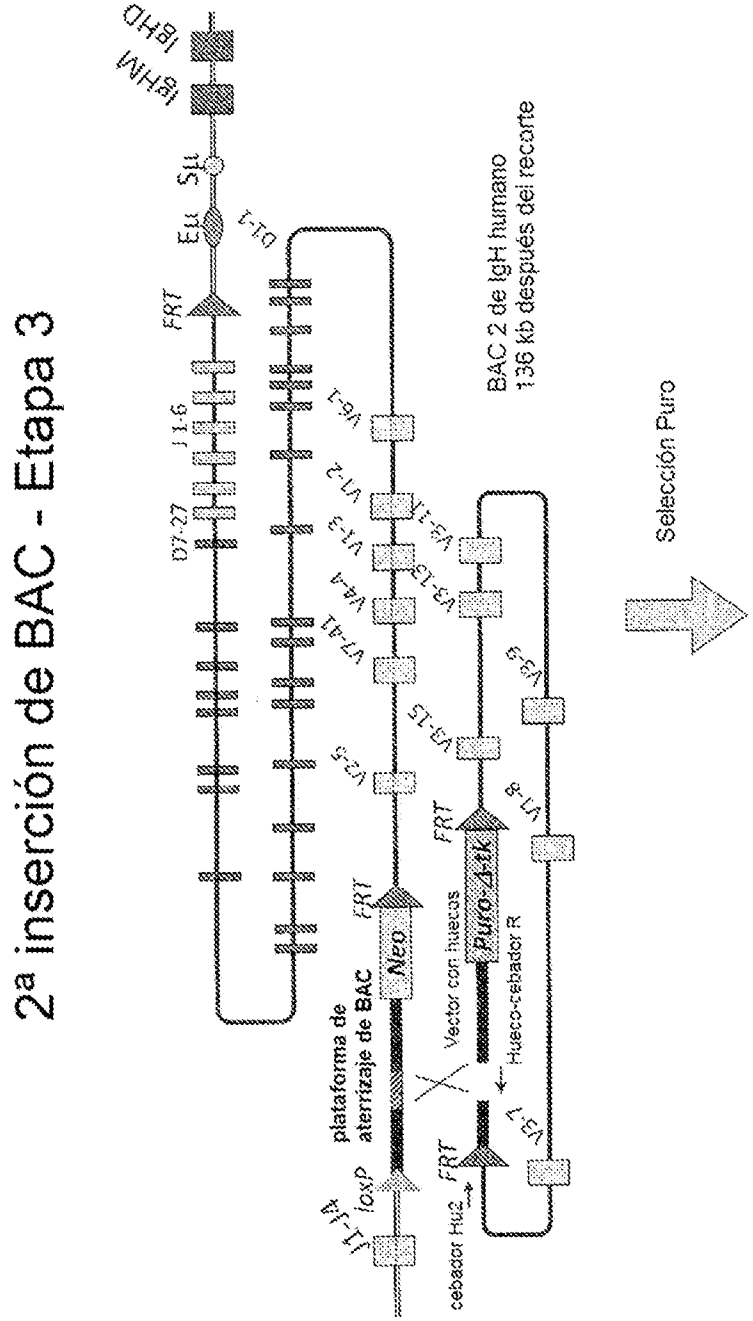

2ª inserción de BAC - Etapa 3
IgHM
IgHD
Sμ
Eμ
FRT
DJ-1
J1-6
D7-27
VH-1
VH-2
VH-3
VH-4
VH-5
VH-15
VH-13
VH-14
VH-41
VH-49
VH-8
VH-7
FRT
Neo
FRT
Puro-TK
plataforma de aterrizaje de BAC
Vector con huecos
Hueco-cebador R
cebador Hu2
FRT
loxP
J1-J4
BAC 2 de IgH humano
136 kb después del recorte
Selección Puro

Fig. 12

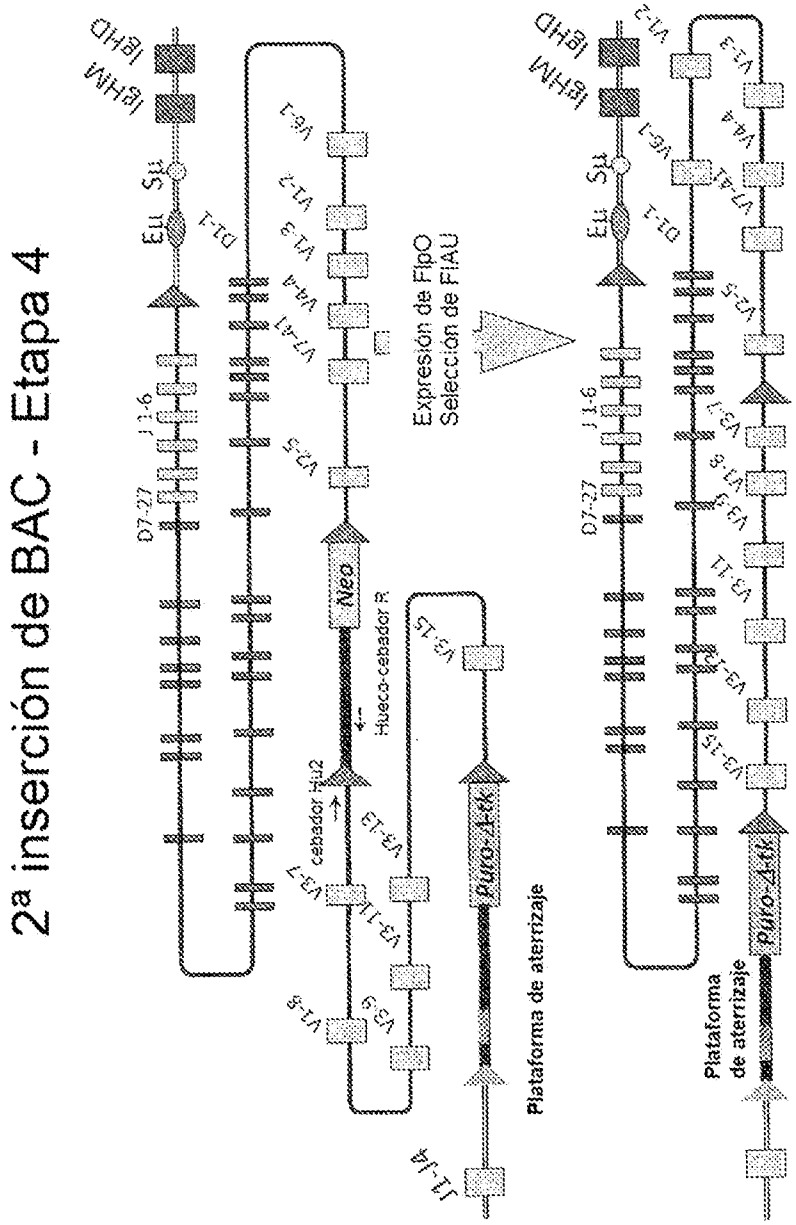

2ª inserción de BAC - Etapa 4
IgHM
IgHD
Eμ
Sμ
D1-1
D7-27
J1-6
VL-1
VL-2
VL-3
VL-4
VL-5
VL-6
VL-7
VL-8
VL-9
VL-11
VL-13
VL-15
Neo
Hueco-cebador R
cebador Hu2
Puro-TK
J1-J4
Plataforma de aterrizaje
Expresión de FlpO
Selección de FIAU
Plataforma
de aterrizaje

Fig. 13

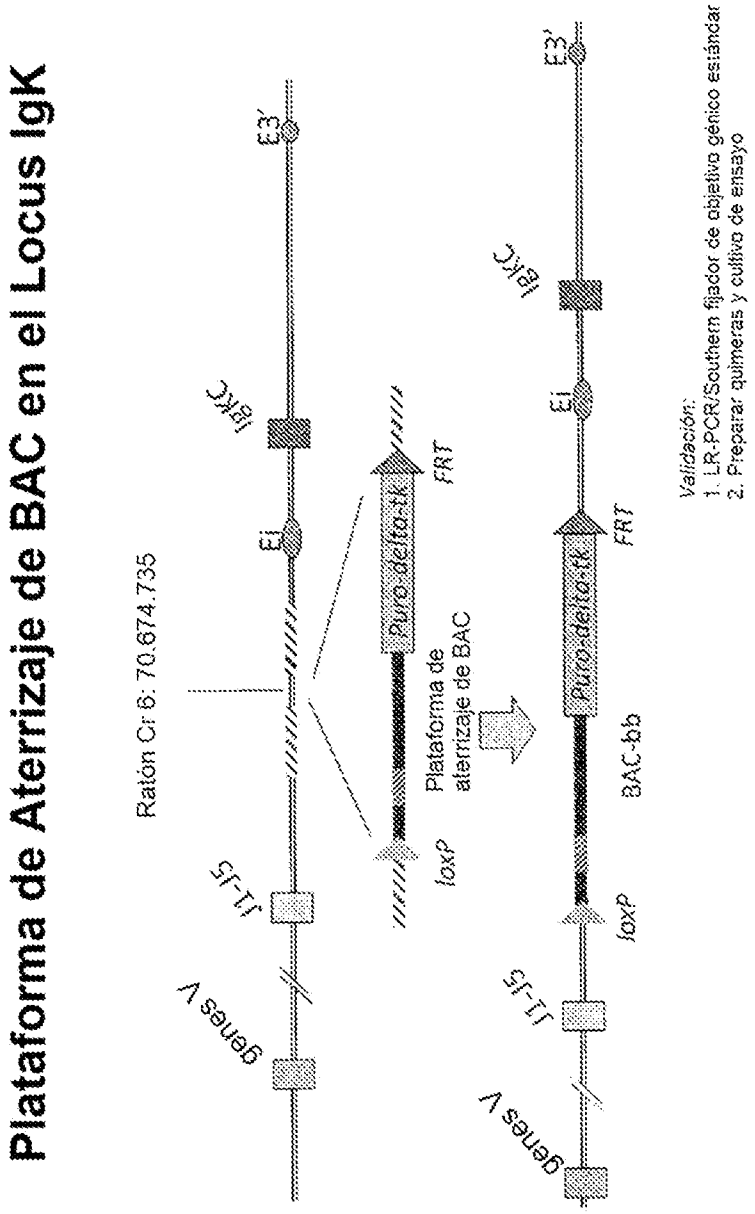

Plataforma de Aterrizaje de BAC en el Locus IgK
Ratón Cr 6: 70.674.735
genes V
J1-J5
IgKC
Ei
E3'
loxP
Puro-delta-tk
FRT
Plataforma de aterrizaje de BAC
BAC-bb
Validación:
1. LR-PCR/Southern fijador de objetivo génico estándar
2. Preparar quimeras y cultivo de ensayo

Fig. 14

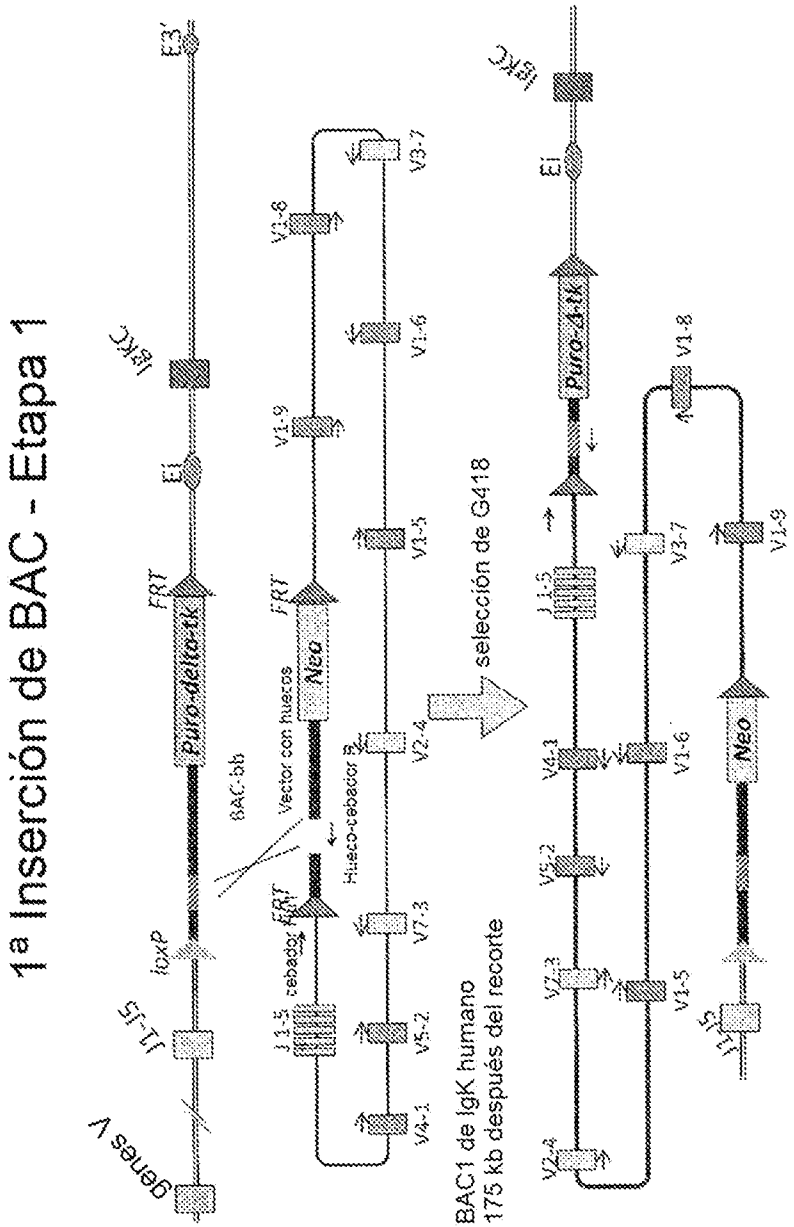

1ª Inserción de BAC - Etapa 1
genes V
J1-15
loxP
FRT
Puro-delta-tk
BAC-bb
E1
IgKC
E3'
FRT
cebador
J1-5
V4-1
V5-2
V7-3
Hueco-cebador B
Vector con huecos
FRT
Neo
V2-4
V1-5
V1-9
V1-6
V1-8
V3-7
BAC1 de IgK humano
175 kb después del recorte
selección de G418
V2-4
V2-3
V5-2
V4-1
J1-5
Puro-Δ-tk
E1
IgKC
V1-5
V1-6
V3-7
Neo
V1-9
V1-8

Fig. 15

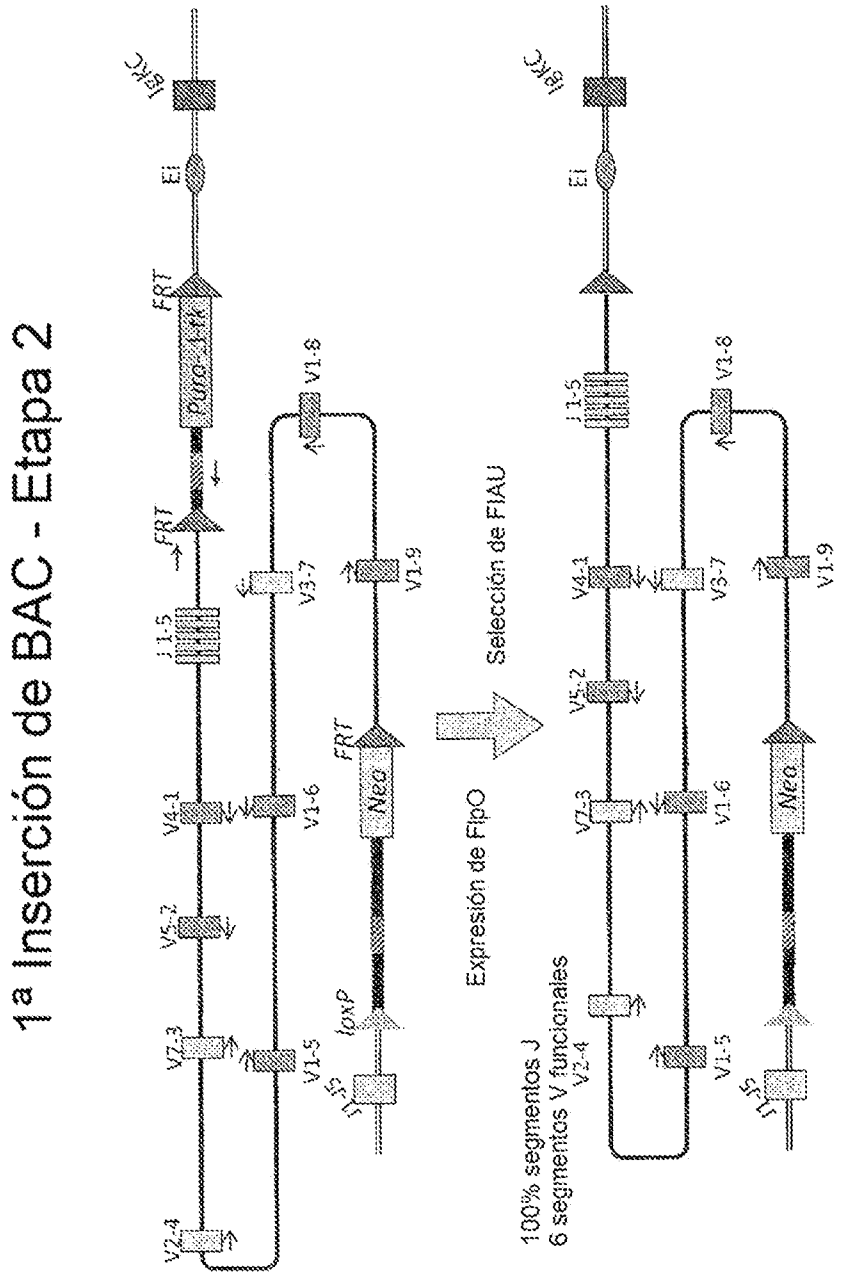

1ª Inserción de BAC - Etapa 2
IgKC
Ei
FRT
Puro-TK
FRT
J1-5
V4-1
V5-2
V7-3
V2-4
V1-6
V1-5
V3-7
V1-8
V1-9
FRT
Neo
loxP
Expresión de FlpO
Selección de FIAU
100% segmentos J
6 segmentos V funcionales

Fig. 16

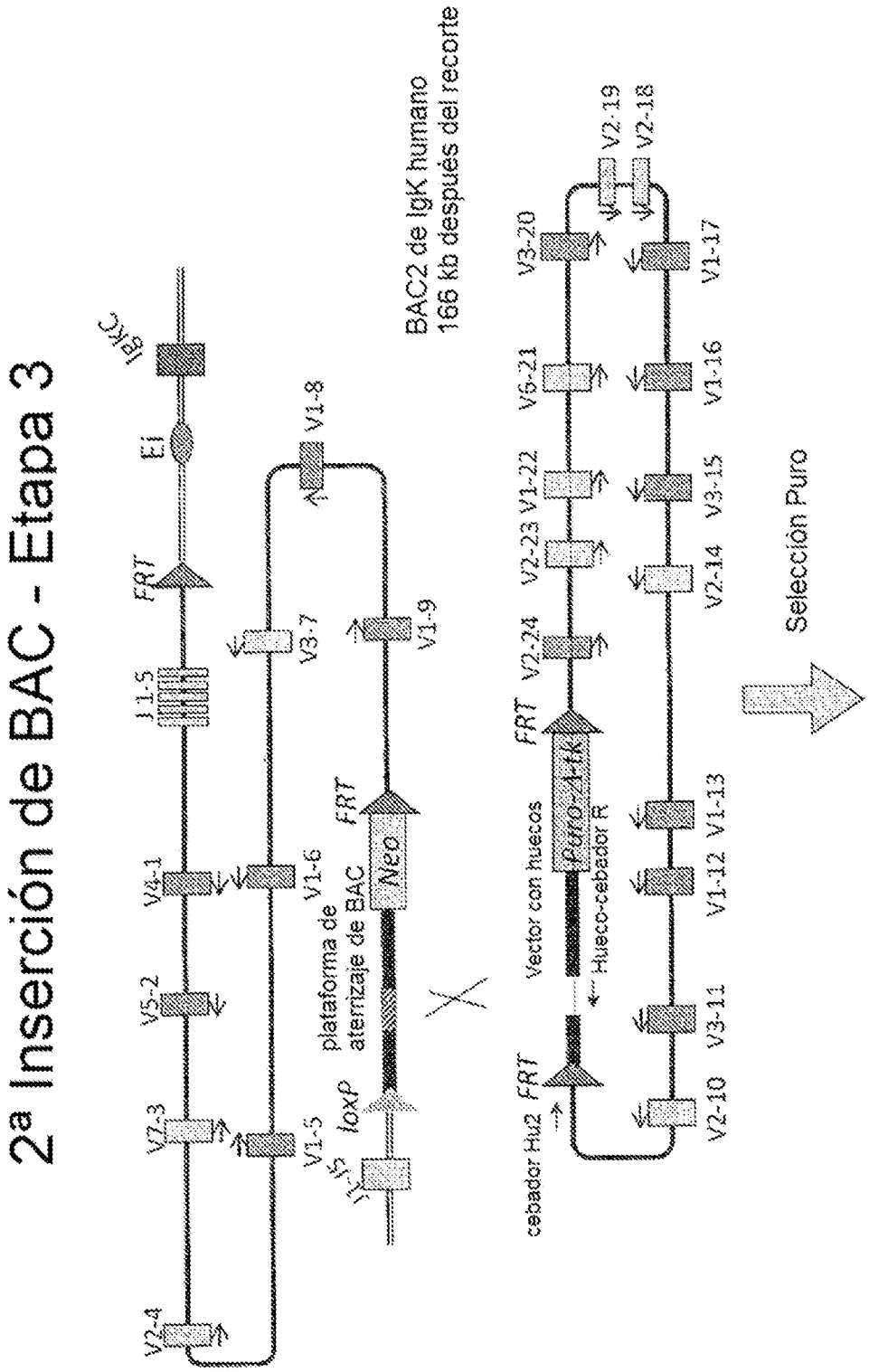

2ª Inserción de BAC - Etapa 3
IgKC
Ei
FRT
J1-5
V4-1
V5-2
V2-3
V2-4
V1-5
loxP
V1-6
V3-7
V1-8
V1-9
plataforma de aterrizaje de BAC
FRT
Neo
BAC2 de IgK humano
166 kb después del recorte
cebador Hu2
FRT
Vector con huecos
Puro-TK
Hueco-cebador R
FRT
V2-24
V2-23
V1-22
V6-21
V3-20
V2-19
V2-18
V1-17
V1-16
V3-15
V2-14
V1-13
V1-12
V3-11
V2-10
Selección Puro

Fig. 17

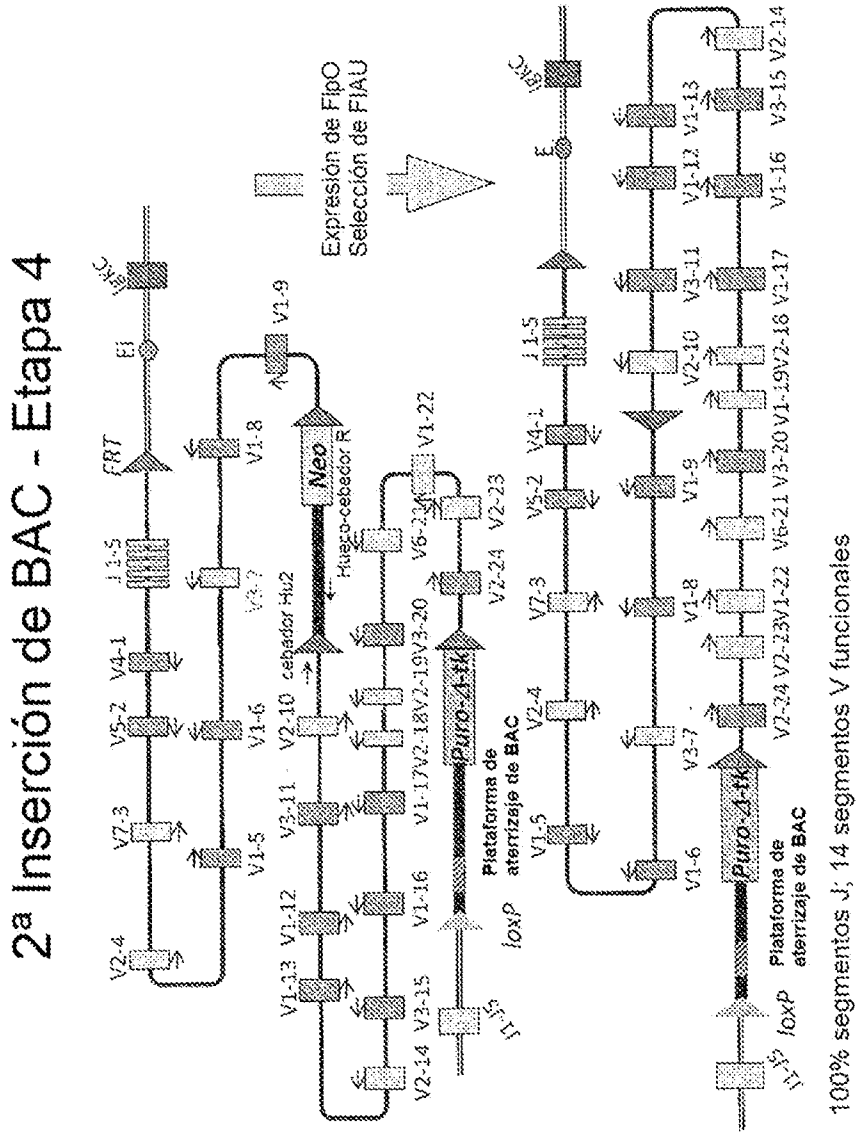

2ª Inserción de BAC - Etapa 4
Expresión de FlpO
Selección de FIAU
FRT
E1
J1-5
V4-1
V5-2
V7-3
V2-4
V1-5
V1-6
V3-7
V1-8
V1-9
Neo
Hueco-cebador R
cebador Hu2
V2-10
V3-11
V1-12
V1-13
V2-14
V3-15
V1-16
V1-17V2-18V2-19V3-20
V6-21
V1-22
V2-23
V2-24
Puro-J-tk
Plataforma de aterrizaje de BAC
loxP
V1-5
V7-3
V2-4
V5-2
V4-1
J1-5
V1-6
V3-7
V1-8
V1-9
V2-10
V3-11
V1-12
V4-13
V3-15
V2-14
V1-16
V2-17
V2-18
V1-19
V3-20
V6-21
V2-22
V1-23
V2-24
Puro-J-tk
Plataforma de aterrizaje de BAC
loxP
100% segmentos J; 14 segmentos V funcionales

Fig. 18

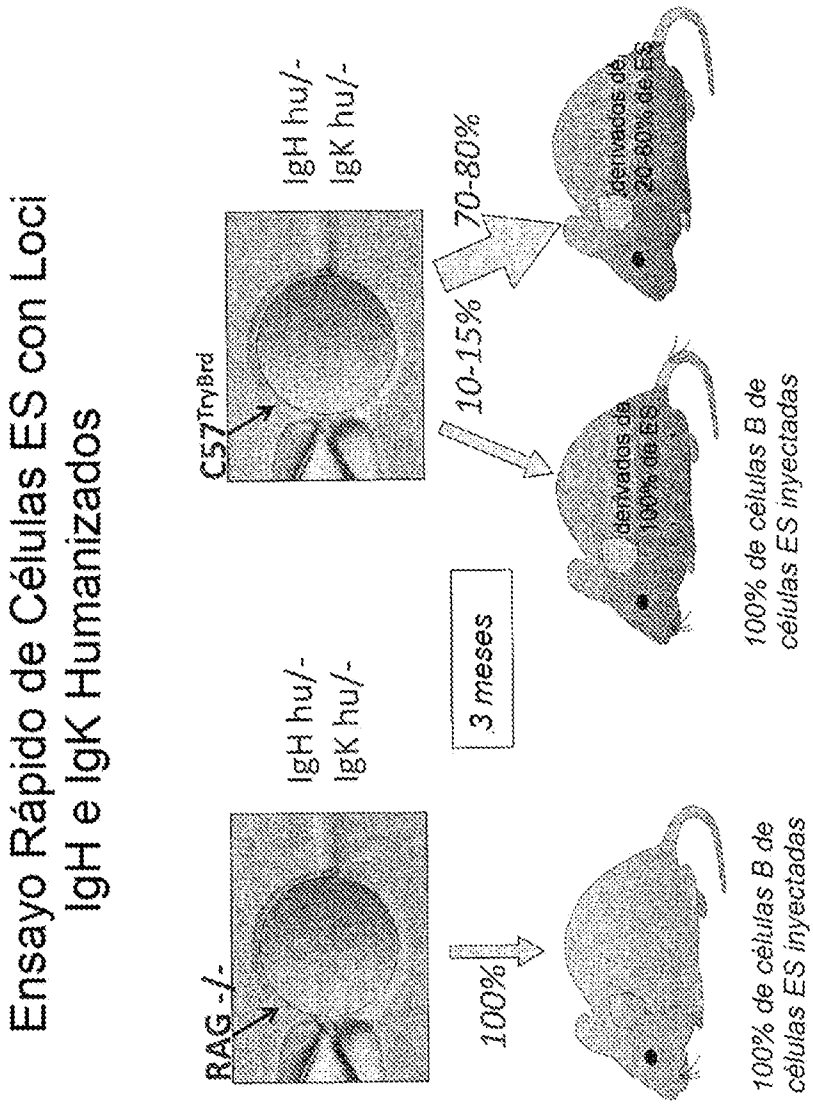

Ensayo Rápido de Células ES con Loci IgH e IgK Humanizados
RAG -/-
IgH hu/-
IgK hu/-
100%
100% de células B de células ES inyectadas
3 meses
C57TryBrd
IgH hu/-
IgK hu/-
10-15%
derivados de 100% de ES
100% de células B de células ES inyectadas
70-80%
derivados de 70-80% de ES

Fig. 19

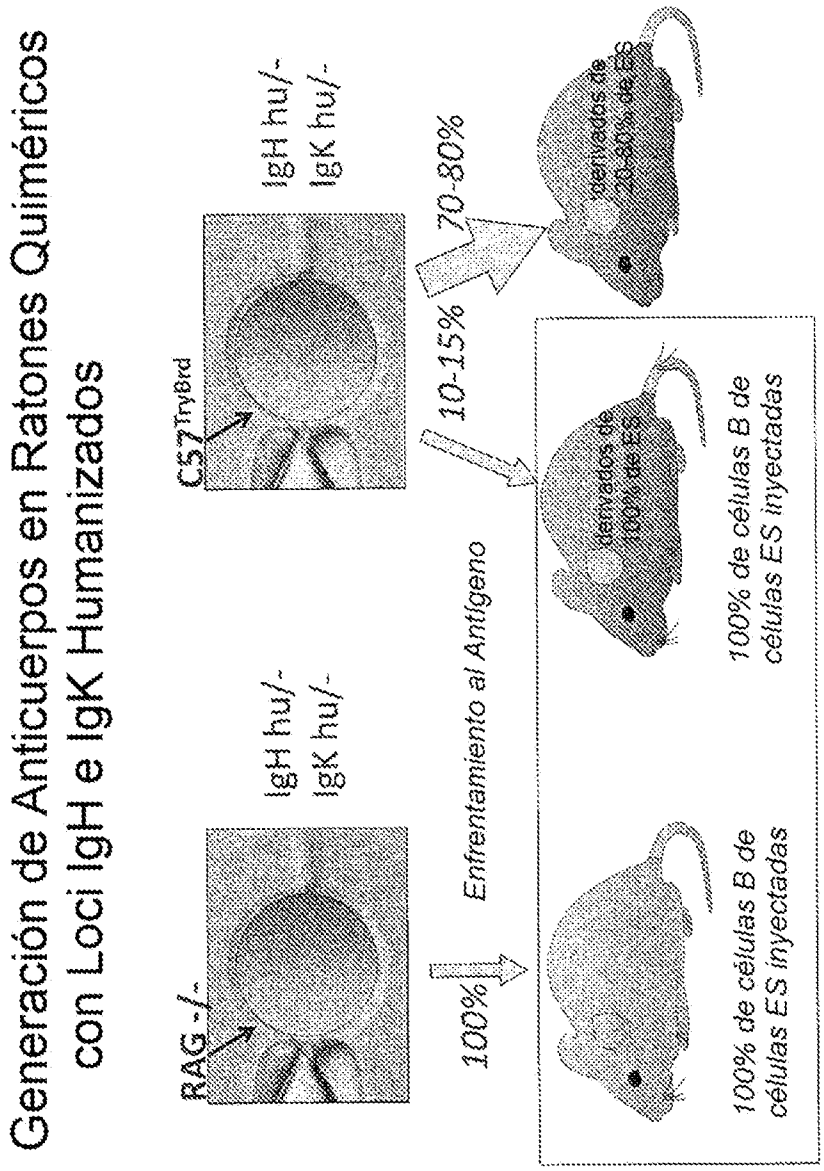

Generación de Anticuerpos en Ratones Quiméricos con Loci IgH e IgK Humanizados
RAG -/-
IgH hu/-
IgK hu/-
100%
Enfrentamiento al Antígeno
100% de células B de células ES inyectadas
C57TryBrd
IgH hu/-
IgK hu/-
10-15%
70-80%
derivados de 100% de ES
derivados de 70-80% de ES
100% de células B de células ES inyectadas

Fig. 20

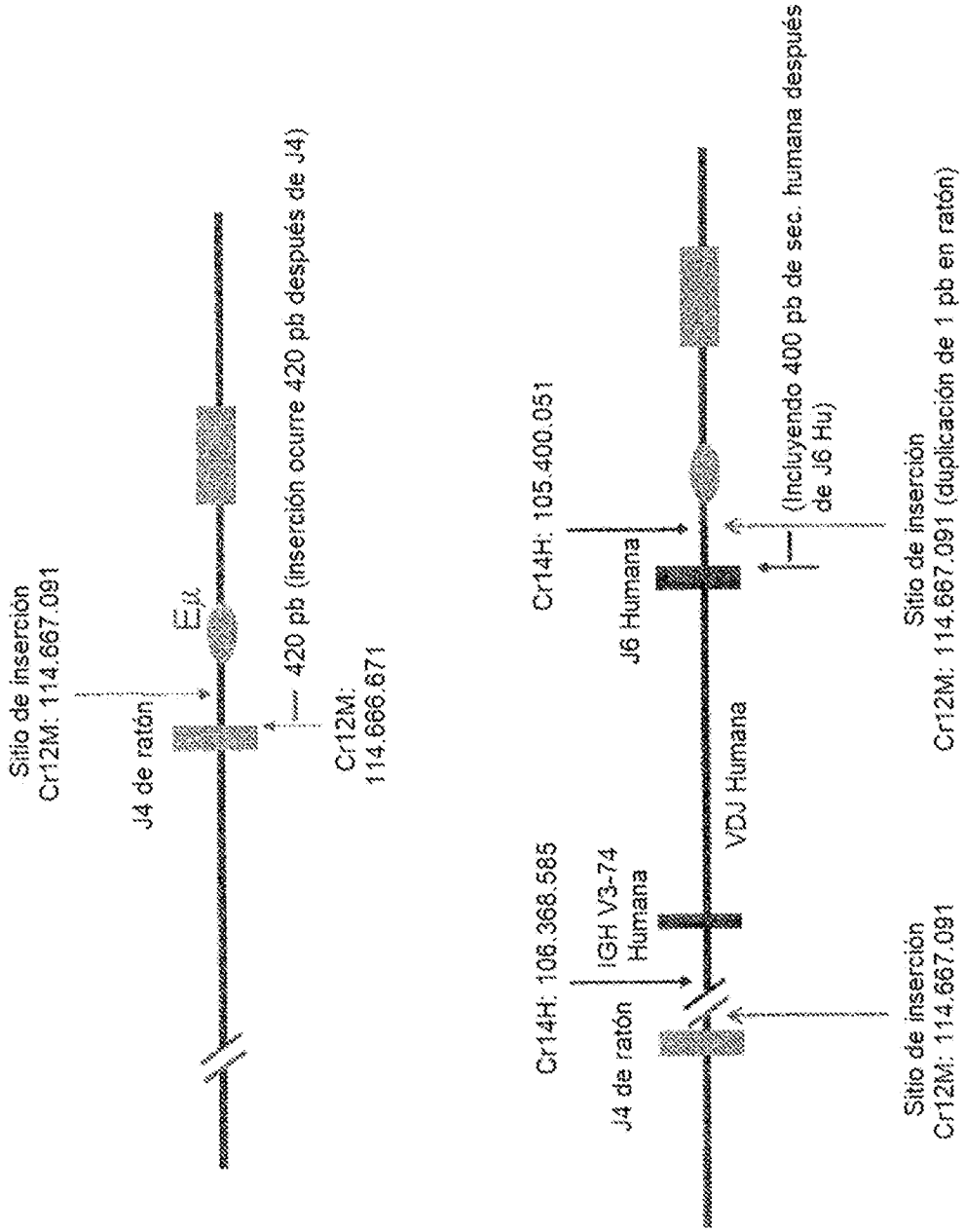

Sitio de inserción
Cr12M: 114.667.091
J4 de ratón
Eμ
420 pb (inserción ocurre 420 pb después de J4)
Cr12M:
114.666.671
Cr14H: 106.368.585
IGH V3-74
Humana
J4 de ratón
VDJ Humana
J6 Humana
Cr14H: 105.400.051
(Incluyendo 400 pb de sec. humana después
de J6 Hu)
Sitio de inserción
Cr12M: 114.667.091
Sitio de inserción
Cr12M: 114.667.091 (duplicación de 1 pb en ratón)

Fig. 21

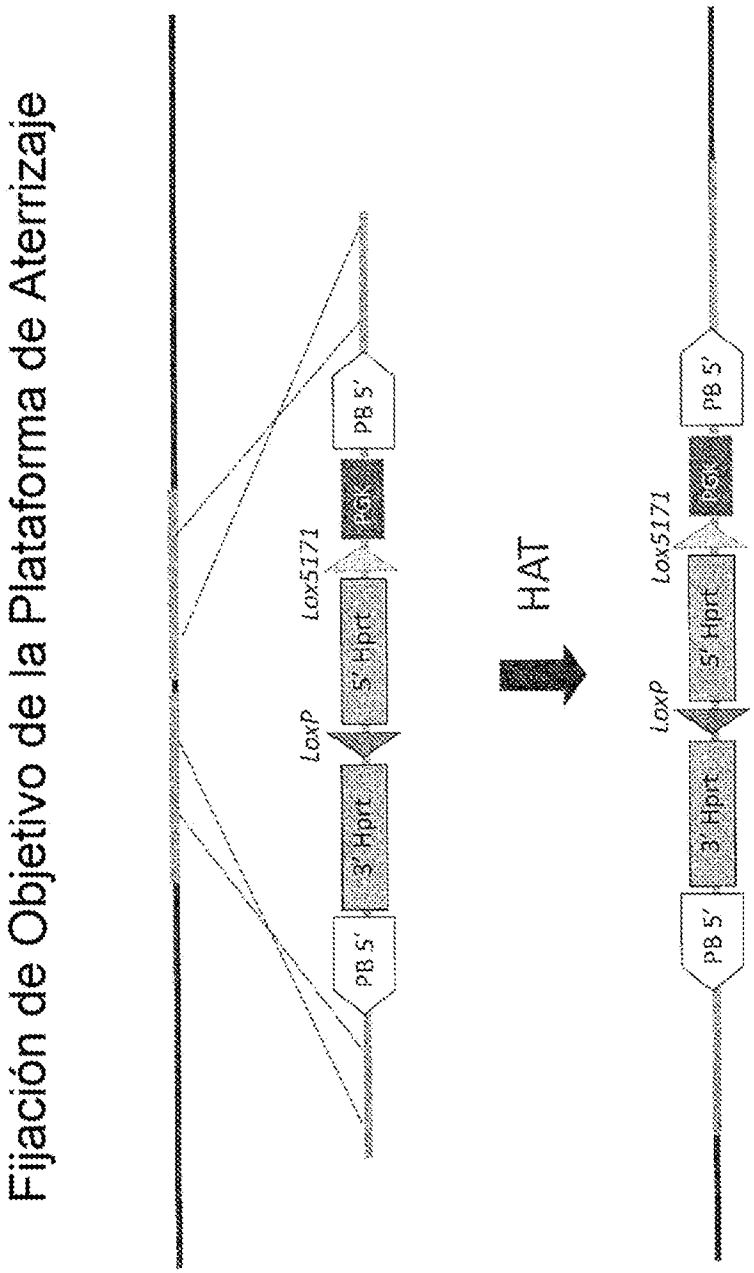

Fijación de Objetivo de la Plataforma de Aterrizaje
PB 5'
3' Hprt
LoxP
5' Hprt
Lox5171
Neo
PB 5'
HAT
PB 5'
Neo
Lox5171
5' Hprt
LoxP
3' Hprt
PB 5'

Fig. 22

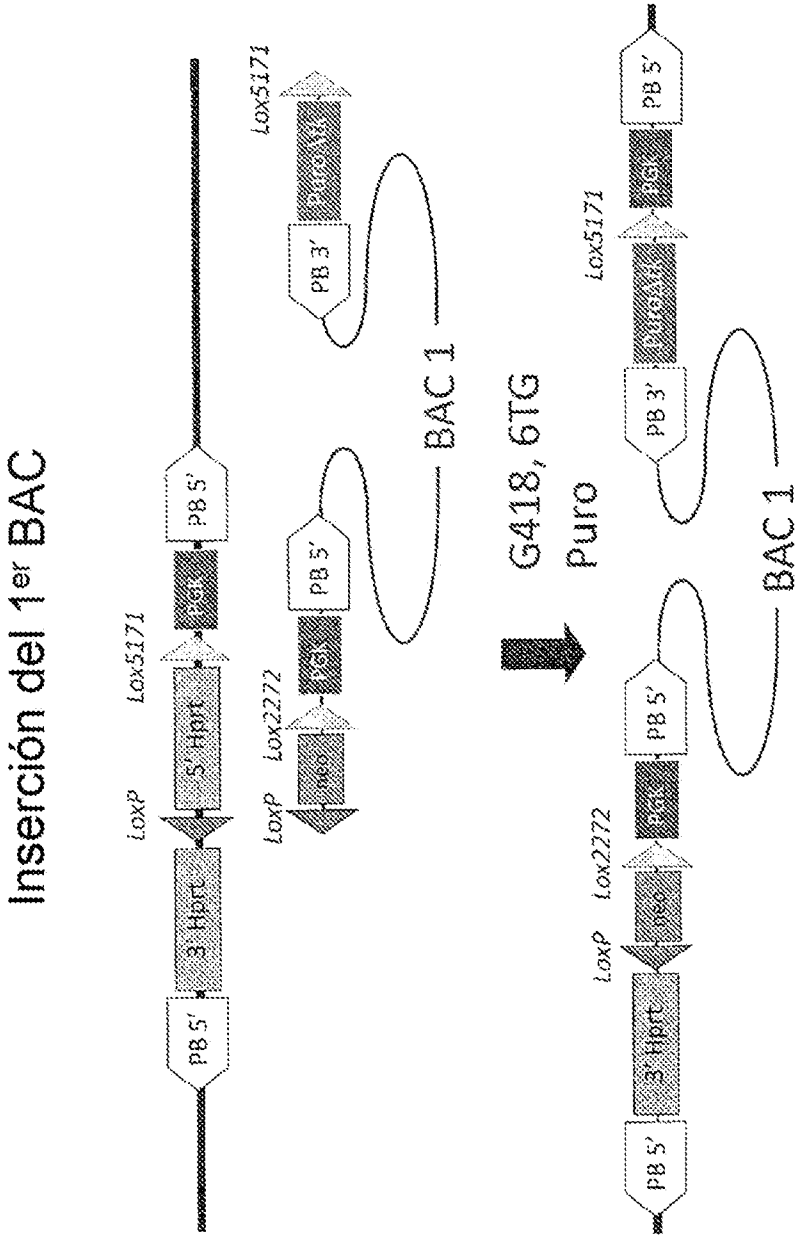

Inserción del 1er BAC
PB 5'
3' Hprt
LoxP
Lox5171
5' Hprt
Pgk
PB 5'
Lox5171
PB 3'
BAC 1
PB 5'
Pgk
Lox2272
LoxP
neo
G418, 6TG
Puro
PB 5'
3' Hprt
LoxP
Lox2272
neo
Pgk
PB 5'
Lox5171
PuroΔTK
PB 3'
BAC 1

Fig. 23

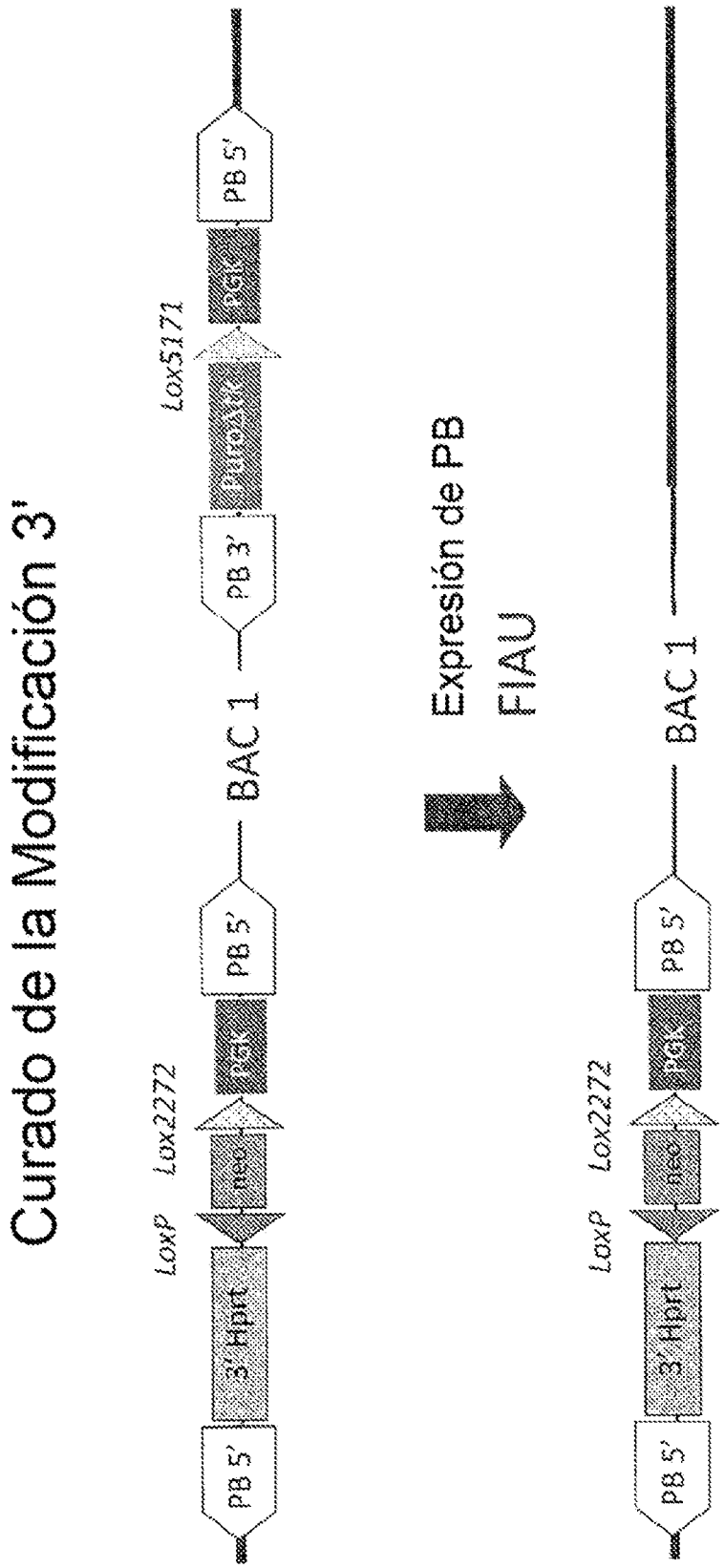

Curado de la Modificación 3'
PB 5'
3' Hprt
LoxP
Lox2272
neo
PGK
PB 5'
BAC 1
PB 3'
Lox5171
PB 5'
Expresión de PB
FIAU
PB 5'
3' Hprt
LoxP
Lox2272
neo
PGK
PB 5'
BAC 1

Fig. 24

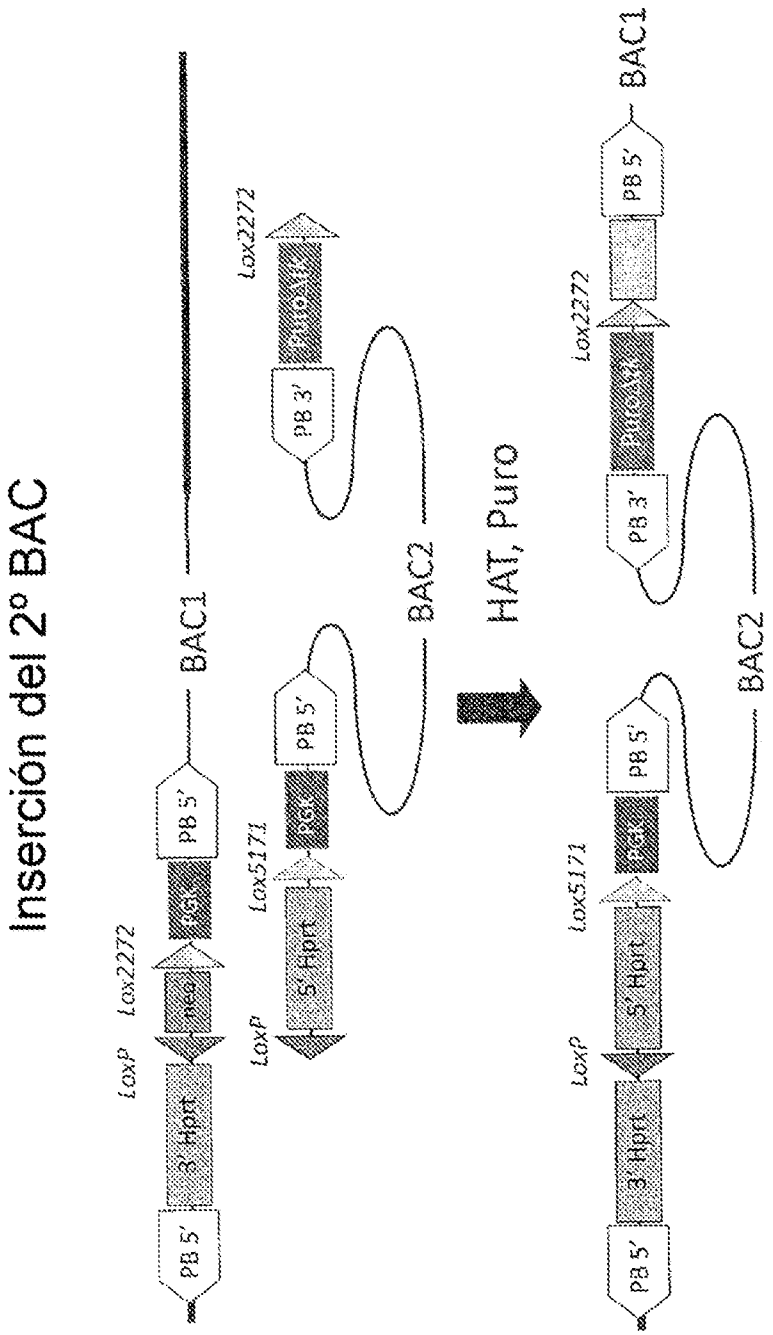

Inserción del 2º BAC
BAC1
PB 5'
3' Hprt
LoxP
Lox2272
neo
PGK
PB 5'
Lox5171
5' Hprt
LoxP
PGK
PB 5'
BAC2
Lox2272
Puro
PB 3'
HAT, Puro
BAC1
PB 5'
Lox2272
Puro
PB 3'
BAC2
PB 5'
PGK
Lox5171
5' Hprt
LoxP
3' Hprt
PB 5'

Fig. 25

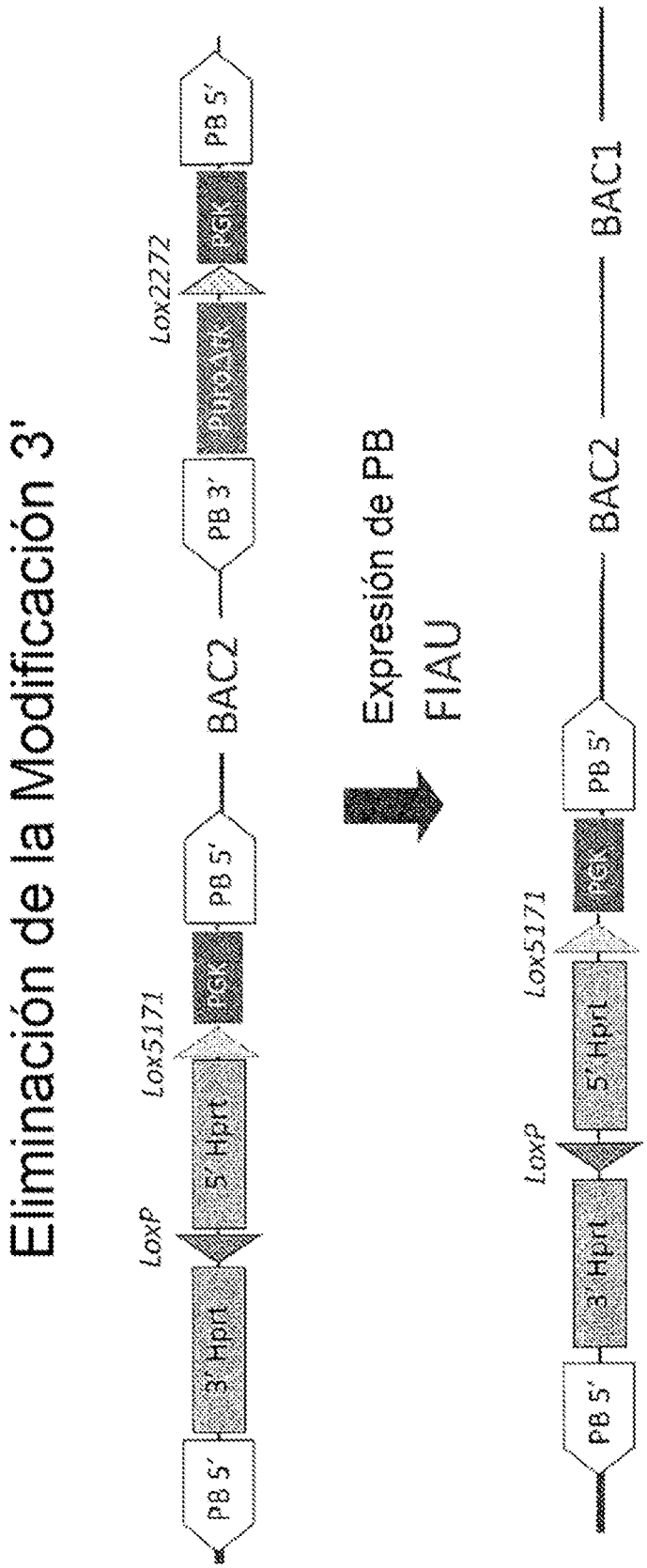

Eliminación de la Modificación 3'
PB 5'
3' Hprt
LoxP
5' Hprt
Lox5171
PGK
PB 5'
BAC2
PB 3'
Puro^R
Lox2272
PGK
PB 5'
Expresión de PB
FIAU
PB 5'
3' Hprt
LoxP
5' Hprt
Lox5171
PGK
PB 5'
BAC2
BAC1

Fig. 26

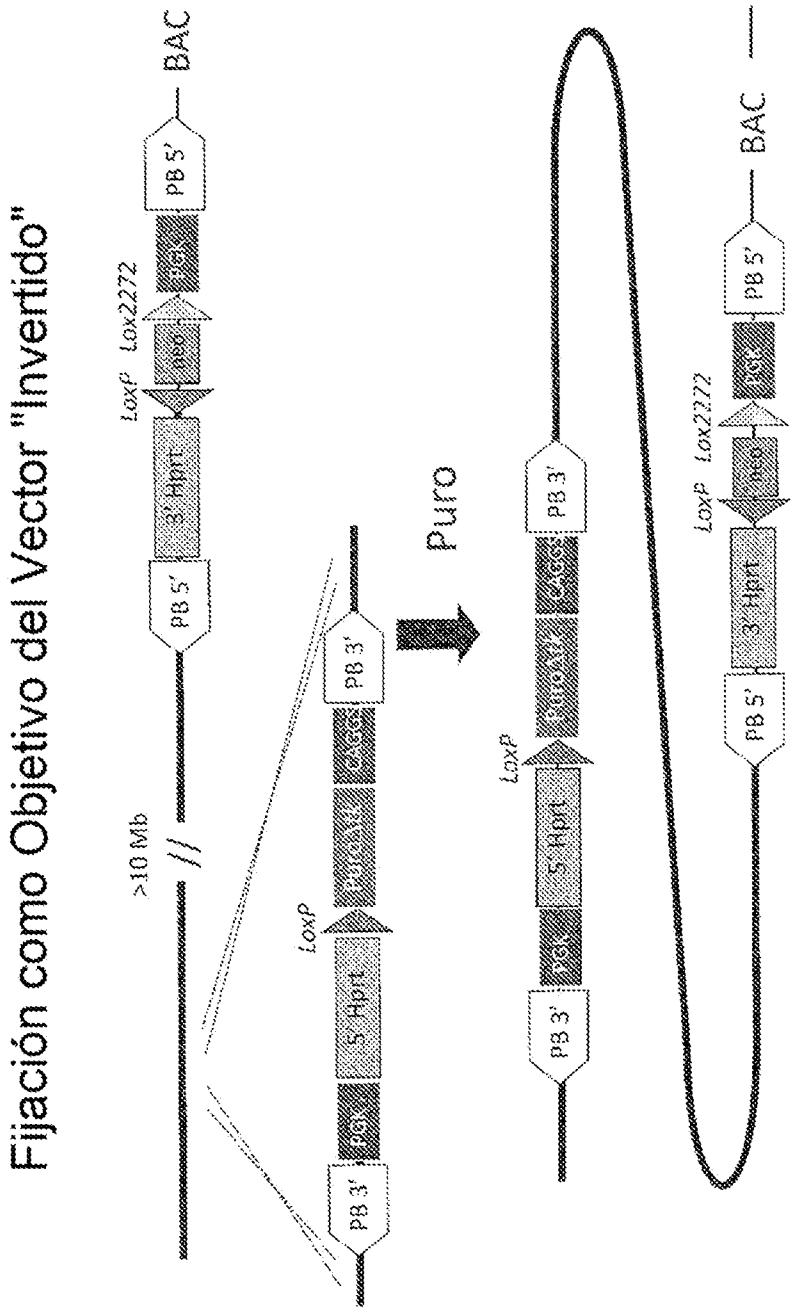

Fijación como Objetivo del Vector "Invertido"
>10 Mb
BAC
PB 5'
3' Hprt
LoxP
Lox2272
PB 3'
5' Hprt
Puro
PB 3'
5' Hprt
LoxP
PB 3'
PB 5'
3' Hprt
LoxP
Lox2272
PB 5'
BAC

Fig. 27

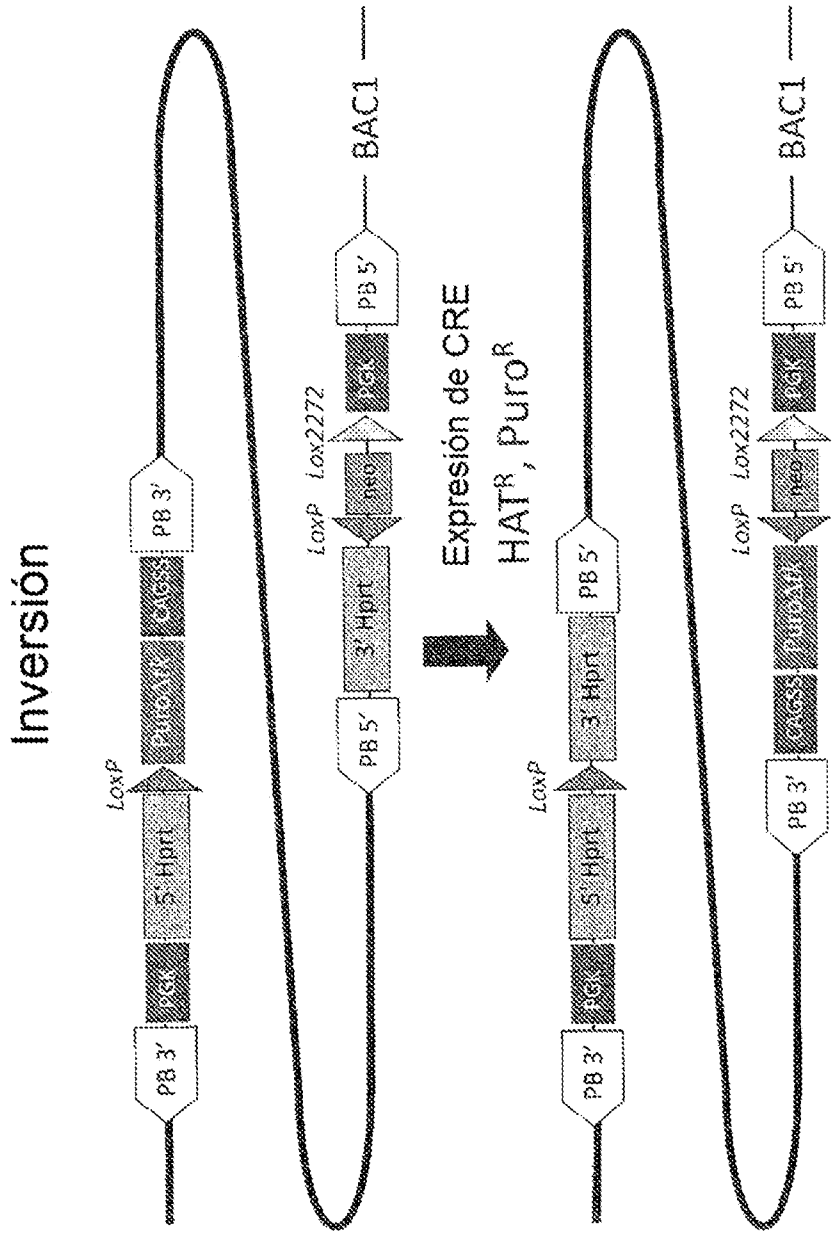

Inversión
PB 3'
PGK
5' Hprt
LoxP
Puro^R
PB 3'
BAC1
PB 5'
3' Hprt
LoxP
Lox2272
neo
PGK
PB 5'
Expresión de CRE
HAT^R, Puro^R
PB 5'
3' Hprt
LoxP
5' Hprt
PGK
PB 3'
BAC1
PB 5'
PGK
LoxP
Lox2272
neo
Puro^R
PB 3'

Fig. 28

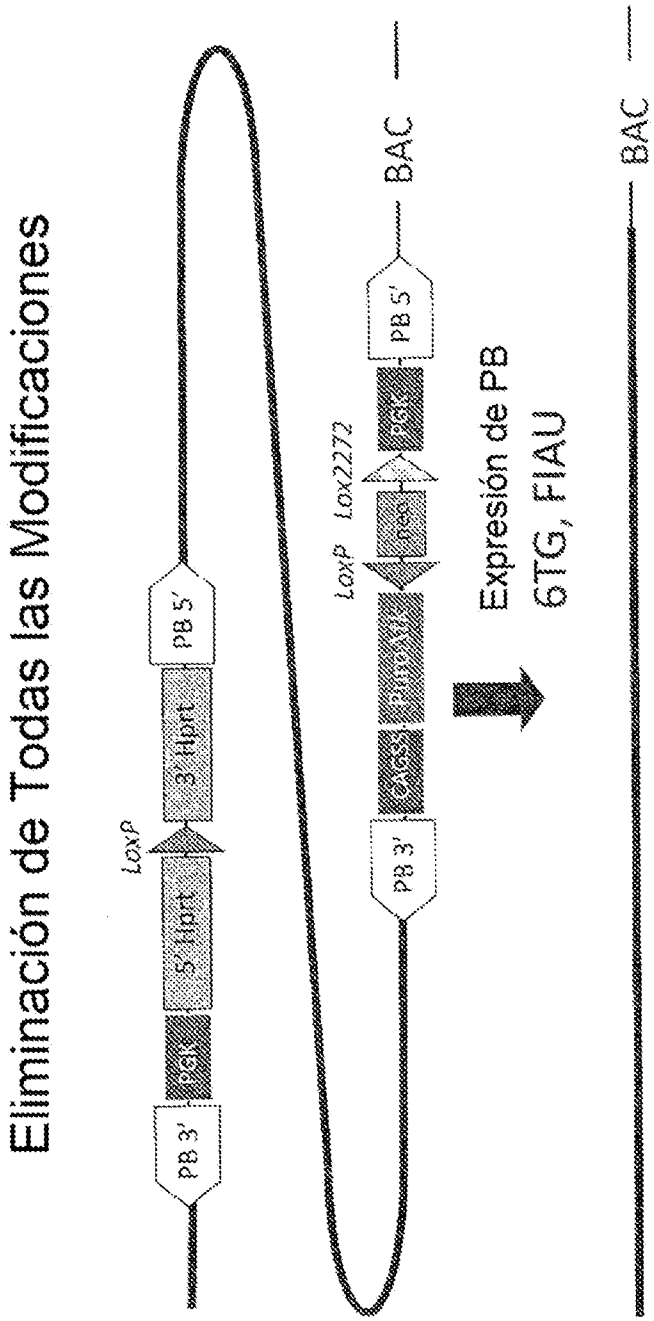
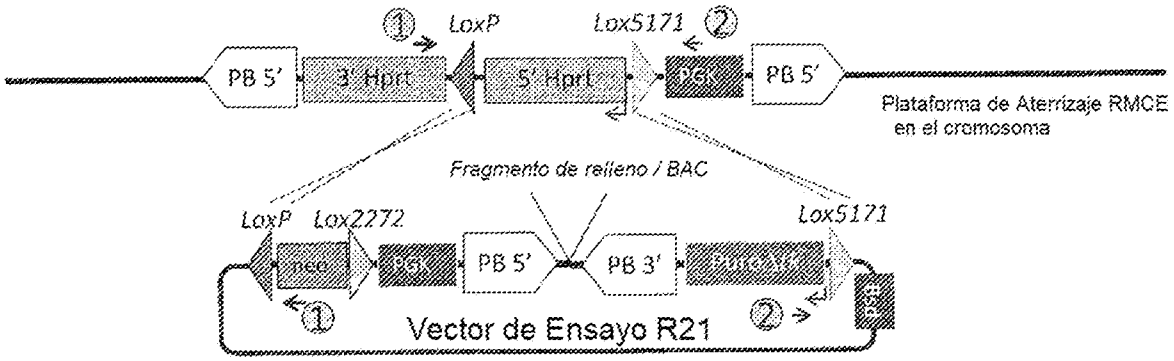

Eliminación de Todas las Modificaciones
PB 3'
PGK
5' Hprt
LoxP
3' Hprt
PB 5'
PB 3'
CAGS
hTRPV1
LoxP
Lox2272
neo
PGK
PB 5'
BAC
Expresión de PB
6TG, FIAU
BAC

Fig. 29

RMCE Secuencial - Integración en la Plataforma de Aterrizaje



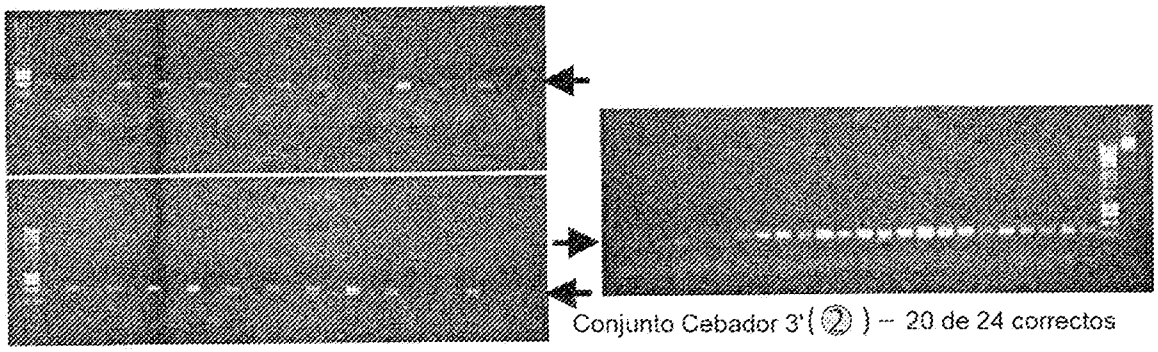
R21 transfectado con Casete de Expresión de Cre

Selección:	Puro	Puro + 6TG	G418	G418 + 6TG
Nº Colonias:	239	220	360	198

Fig. 30

Confirmación de Inserción con Éxito en Plataforma de Aterrizaje

Colonias: Resistentes a 6-TG y Puro



Conjunto Cebador 3' (②) – 20 de 24 correctos

Conjunto Cebador 5' (①) – 23 de 24 correctos

Sumario:

	Puro + 6TG		Puro		G418 + 6TG		G418	
Colonia N°	220		239		198		360	
PCR unión	5'	3'	5'	3'	5'	3'	5'	3'
	23/24	20/24	22/24	19/24	22/24	22/24	11/24	11/24

Fig. 31

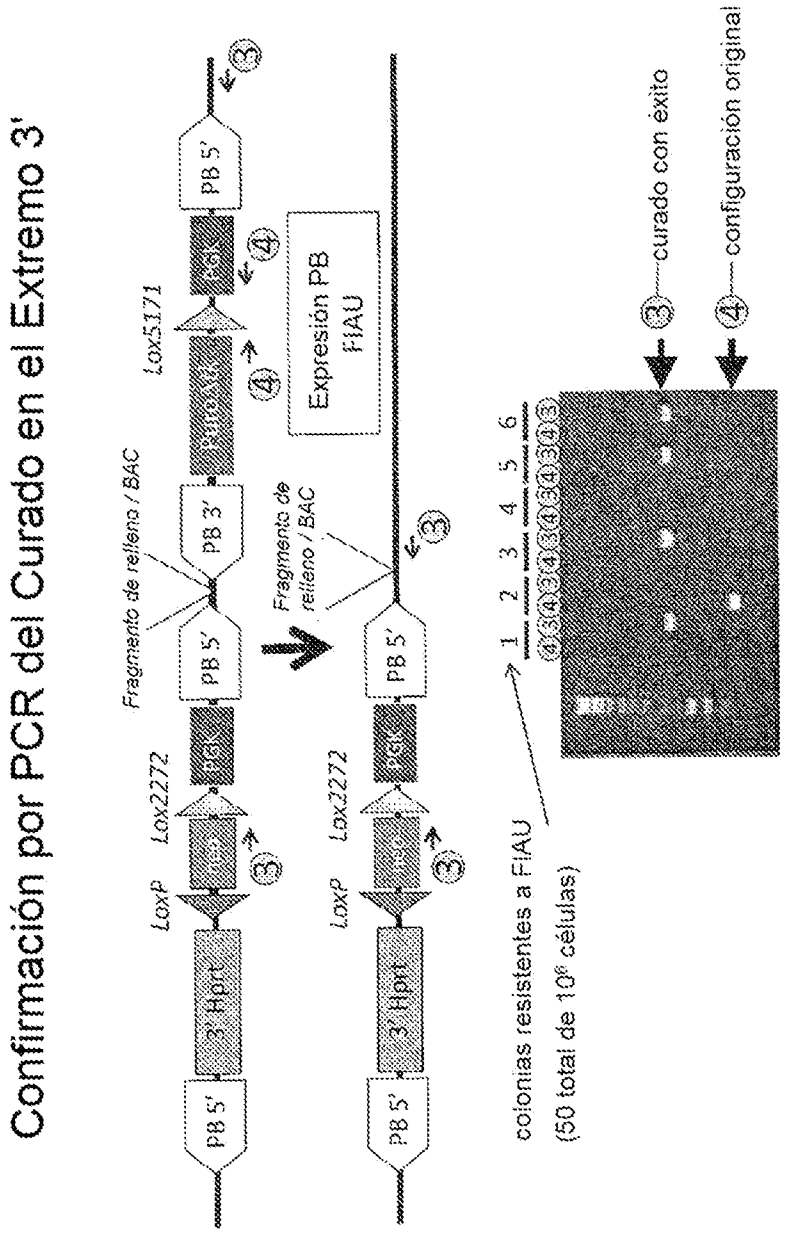

Confirmación por PCR del Curado en el Extremo 3'
PB 5'
3' Hprt
LoxP
Lox2272
PGK
PB 5'
Fragmento de relleno / BAC
PB 3'
Lox5171
Puro^R
PGK
PB 5'
Fragmento de relleno / BAC
PB 5'
LoxP
Lox2272
PGK
3' Hprt
PB 5'
Expresión PB FIAU
colonias resistentes a FIAU
(50 total de 10^6 células)
1 2 3 4 5 6
curado con éxito
configuración original

Fig. 32

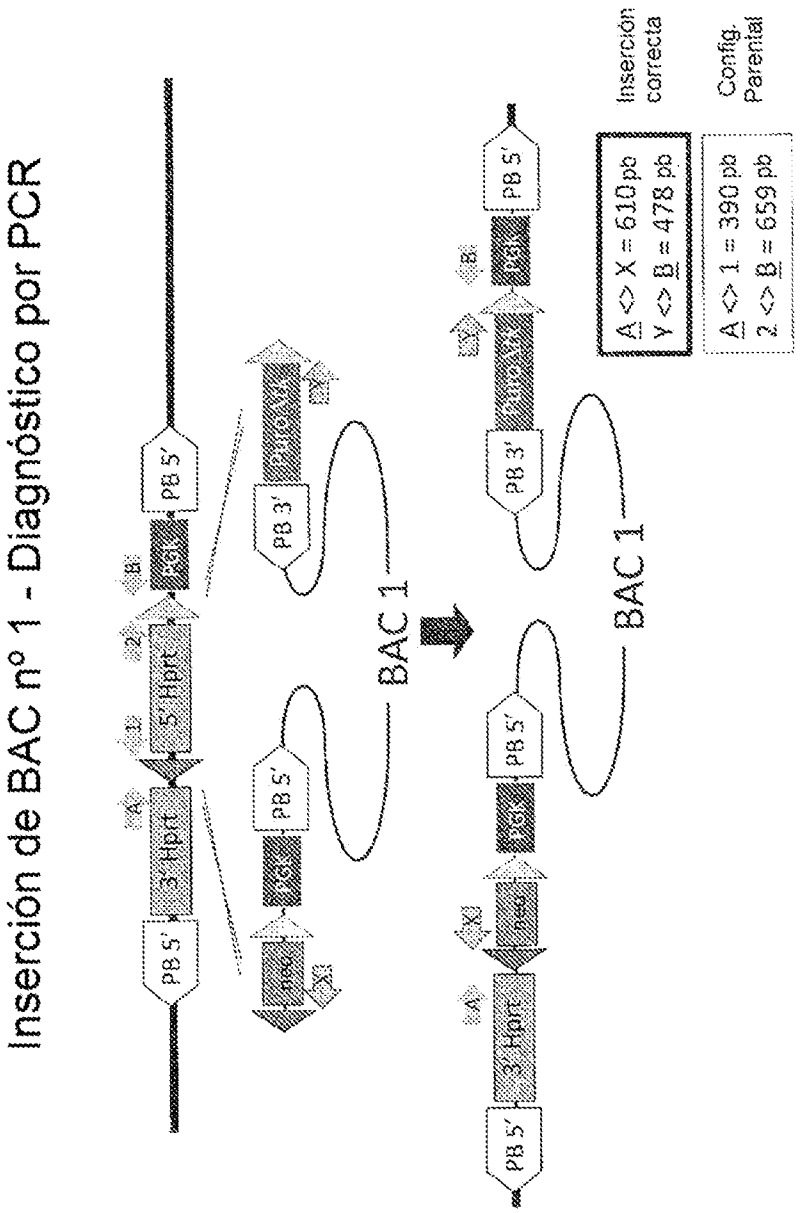
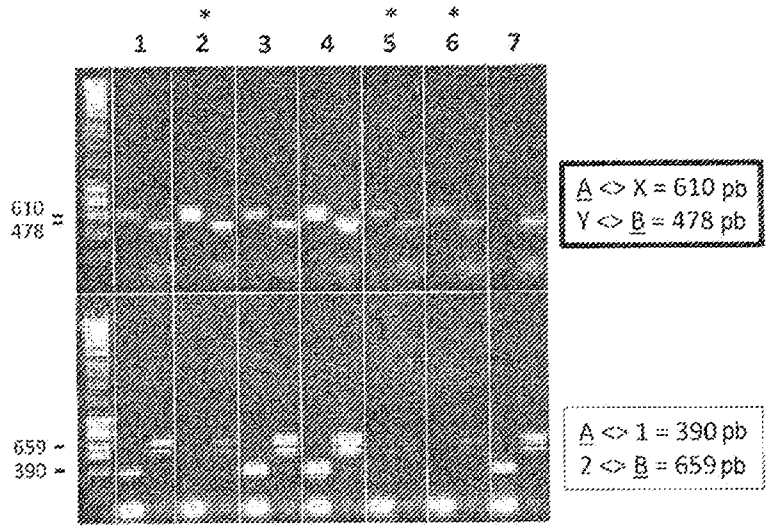

Inserción de BAC nº 1 - Diagnóstico por PCR
PB 5'
3' Hprt
5' Hprt
PB 5'
PB 3'
BAC 1
BAC 1
PB 5'
PB 3'
Inserción correcta
A <> X = 610 pb
Y <> B = 478 pb
Config. Parental
A <> 1 = 390 pb
2 <> B = 659 pb

Fig. 33

Inserción de BAC nº 1 - Diagnóstico por PCR



* Clones nº 2, 5 y 6 tienen BAC nº 1 insertado

Clones nº 1, 3, 4 y 7 tiene probablemente BAC nº1 insertado, pero las muestras se mezclan con líneas celulares parentales.

Fig. 34