

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 954 865**

51 Int. Cl.:

**A01K 67/027** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.04.2016** **PCT/US2016/026260**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2016** **WO16164492**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2016** **E 16766106 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023** **EP 3280257**

54 Título: **Respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T humanizados en animales no humanos**

30 Prioridad:

**06.04.2015 US 201562143687 P**  
**08.05.2015 US 201562158804 P**  
**30.06.2015 US 201562186935 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.11.2023**

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.**  
**(100.0%)**  
**777 Old Saw Mill River Road**  
**Tarrytown, NY 10591-6707, US**

72 Inventor/es:

**MACDONALD, LYNN;**  
**MURPHY, ANDREW J.;**  
**GURER, CAGAN y**  
**KYRATSOUS, CHRISTOS**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

### Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 954 865 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

Respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T humanizados en animales no humanos

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a roedores, por ejemplo, ratones o ratas) capaces de montar respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T sustancialmente humanos (o humanizados) y expresar (i) uno o más correceptores de linfocitos T humanos (o humanizados) (por ejemplo, CD4 y/o CD8 (por ejemplo, CD8 $\alpha$  y/o CD8 $\beta$ )), (ii) uno o más complejos mayores de histocompatibilidad humanos (o humanizados) que se asocian a uno o más correceptores de linfocitos T humanos (o humanizados) (por ejemplo, MHC II (por ejemplo, MHC  $\alpha$  y/o MHC II  $\beta$ ) y/o MHC I (por ejemplo, MHC I  $\alpha$  y/o  $\beta$ 2 microglobulina)) y (iii) un receptor de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés) humano (o humanizado) (por ejemplo, TCR $\alpha$  y/o TCR $\beta$ ); a métodos de generación de los roedores

15 **Antecedentes de la invención**

En la respuesta inmunoadaptativa, moléculas receptoras en los linfocitos B (por ejemplo, inmunoglobulinas) y linfocitos T (por ejemplo, receptor de linfocitos T, también denominado TCR) reconocen antígenos extraños. Estos antígenos extraños se presentan sobre la superficie de células como fragmentos peptídicos por proteínas especializadas, genéricamente denominadas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) y específicamente denominadas antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés) en seres humanos. Durante una respuesta mediada por linfocitos T, un receptor de linfocitos T reconoce antígenos presentados por las moléculas del MHC. Sin embargo, para una respuesta inmunitaria eficaz se requiere algo más que el reconocimiento por parte del receptor de linfocitos T del complejo MHC-antígeno. También se requiere la unión de una molécula de correceptor de linfocitos T (por ejemplo, CD4 o CD8) a una porción invariante del MHC.

Los linfocitos T vienen en varias variedades, los incluyendo linfocitos T auxiliares y/o los linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T auxiliares expresan el correceptor de CD4 y reconocen antígenos unidos a moléculas del MHC II. Los linfocitos T CD4+ activan otras células efectoras en el sistema inmunitario, por ejemplo, MHC II que expresa linfocitos B para producir anticuerpos, MHC II que expresa macrófagos para destruir patógenos, etc. La unión de CD4 y el receptor de linfocitos T al mismo antígeno extraño presentado por el MHC II hace que un linfocito T sea significativamente más sensible a ese antígeno.

En cambio, los linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés) expresan el correceptor de CD8 y reconocen antígenos extraños unidos a moléculas del MHC I. Los CTL están especializados en destruir cualquier célula que porte un péptido unido a MHC I reconocido por su propio TCR unido a membrana. Cuando una célula presenta péptidos derivados de proteínas celulares que normalmente no están presentes (por ejemplo, de origen vírico, tumoral o de otro origen no propio), dichos péptidos son reconocidos por los CTL, que se activan y destruyen la célula que presenta el péptido. Similar a CD4, la participación de CD8 hace que los CTL sean más sensibles al antígeno presentado por MHC I.

No todos los antígenos provocarán la activación de linfocitos T debido a los mecanismos de tolerancia. Sin embargo, en algunas enfermedades (por ejemplo, el cáncer, enfermedades autoinmunitarias) los péptidos derivados de algunas proteínas propias se convierten en la diana del componente celular del sistema inmunitario, lo que da como resultado la destrucción de las células que presentan dichos péptidos. Ha habido avances significativos en el reconocimiento de antígenos que son clínicamente significativos (por ejemplo, antígenos asociados a diversos tipos de cáncer) y/o secuencias del TCR que se unen a los antígenos clínicamente significativos. Sin embargo, con el fin de mejorar la identificación y selección de péptidos clínicamente significativos que provocarán una respuesta adecuada en un linfocito T humano y/o del TCR capaz de unirse a los antígenos clínicamente significativos (por ejemplo, para inmunoterapia adoptiva del cáncer, vacunación con linfocitos T para autoinmunidad, etc.), sigue existiendo la necesidad de sistemas *in vivo* e *in vitro* que imiten aspectos del sistema inmunitario humano. Por lo tanto, existe la necesidad de sistemas biológicos (por ejemplo, células y animales no humanos modificados genéticamente) que puedan presentar componentes de un sistema inmunitario humano, particularmente componentes de la respuesta inmunitaria de los linfocitos T.

55 **Sumario de la invención**

Como se desvela en el presente documento, el timo de animales no humanos modificados genéticamente que comprenden un sistema inmunitario de linfocitos T sustancialmente humanizados tiene números absolutos similares de timocitos y linfocitos T CD3+ que los animales de control. Adicionalmente, estas células muestran un desarrollo comparable en linfocitos T positivos únicos para animales de control y son capaces de generar una respuesta celular humana robusta contra el antígeno, por ejemplo, un antígeno vírico. La respuesta celular humana de los animales no humanos generalmente comprende linfocitos T no humanos activados que expresan dominios variables del receptor de linfocitos T (TCR) humano o humanizado que reconocen el antígeno presentado en la hendidura de unión de péptidos formada por dominios extracelulares del antígeno leucocitario humano (HLA), que puede expresarse en la superficie de células presentadoras de antígenos no humanos. Como se desvela en el presente documento, el sistema

inmunitario de linfocitos T sustancialmente humanizados puede comprender

(A) un linfocito T de roedor que expresa

5 (i) un polipéptido del correceptor de linfocitos T que comprende una parte o la totalidad de la porción extracelular de un correceptor de linfocitos T humano, por ejemplo, un polipéptido del correceptor de linfocitos T que comprende uno o más dominios extracelulares de correceptor de linfocitos T humano de manera que el polipéptido del correceptor de linfocitos T es capaz de asociarse a y/o se asocia a

10 (a) uno o más dominios extracelulares de una molécula de HLA humano o humanizado (por ejemplo, un primer dominio extracelular de HLA humano que es un sitio de unión para el polipéptido del correceptor de linfocitos T y/o un segundo dominio extracelular de HLA humano que forma una hendidura de unión peptídica, por ejemplo, con un tercer dominio extracelular de HLA humano),

15 (b) un dominio extracelular de un dominio variable del TCR humano o humanizado (por ejemplo, un dominio variable del TCR $\alpha$  humano o humanizado y/o un dominio variable del TCR $\beta$  humano o humanizado que está codificado respectivamente por al menos un segmento génico de la región variable del TCR $\alpha$  y/o TCR $\beta$  humano), y/o

(c) un dominio extracelular de un dominio constante del TCR humano, y

20 (ii) un receptor de linfocitos T (TCR) que comprende al menos un dominio variable del TCR humano; y opcionalmente

(B) una célula presentadora de antígeno de roedor que presenta antígeno en el contexto de HLA humano, por ejemplo, una célula presentadora de antígeno de roedor que expresa en su superficie celular al menos una molécula del MHC que comprende una hendidura de unión a péptido formada por dos dominios extracelulares de HLA humano, y es capaz de activar y/o activa el linfocito T de roedor.

En un aspecto, el linfocito T de roedor y la célula presentadora de antígeno de roedor se encuentran o se aíslan del mismo roedor

30 En consecuencia, en el presente documento se proporcionan roedores (por ejemplo, ratones o ratas) modificados por ingeniería genética para expresar

35 (A) un correceptor de linfocitos T humano o humanizado (por ejemplo, CD4 humano o humanizado y/o CD8 humano o humanizado (por ejemplo, CD8 $\alpha$  humano o humanizado y/o CD8 $\beta$  humano o humanizado)),

(B) un complejo mayor de histocompatibilidad humano o humanizado que se asocia al correceptor de linfocitos T humano o humanizado (por ejemplo, MHC II humano o humanizado (por ejemplo, MHC II  $\alpha$  humano o humanizado y/o MHC II  $\beta$  humano o humanizado) que se une al CD4 humano o humanizado y/o MHC I humano o humanizado (por ejemplo, MHC I  $\alpha$  humano o humanizado, y opcionalmente  $\beta$ 2 microglobulina humana o humanizada) que se une al CD8 humano o humanizado), y/o

40 (C) un receptor de linfocitos T (TCR) humano o humanizado;

También se desvelan métodos de generación y uso de los roedores desvelados.

45 En un aspecto, se proporciona un roedor modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 1

El roedor comprende

50 (A) un correceptor de CD4 humanizado y un correceptor de CD8 humanizado que comprende un polipéptido de CD8 $\alpha$  humanizado y un polipéptido de CD8 $\beta$  humanizado en donde el roedor comprende, por ejemplo, en su genoma de estirpe germinal, una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD4 quimérico humano/de roedor, una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8 $\alpha$  quimérico humano/de roedor y una tercera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8 $\beta$  quimérico humano/de roedor),

55 en donde cada polipéptido del correceptor de linfocitos T humanizado comprende al menos dominios transmembrana y citoplasmáticos de un correceptor de linfocitos T de roedor, en donde el correceptor de CD4 humanizado comprende al menos dominios transmembrana y citoplasmáticos de un correceptor de CD4 de roedor y el correceptor de CD8 humanizado comprende al menos dominios transmembrana y citoplasmáticos de polipéptidos de CD8 $\alpha$  de roedor y de CD8 $\beta$  no humano,

60 en donde cada polipéptido del correceptor de linfocitos T quimérico comprende parte o la totalidad de una porción extracelular de un correceptor de linfocitos T humano, por ejemplo, uno o más dominios extracelulares de un correceptor de linfocitos T humano, por ejemplo, al menos un dominio extracelular de un correceptor de linfocitos T humano que se asocia a una molécula de HLA, por ejemplo, en donde el correceptor de CD4 humanizado comprende la porción extracelular (o partes de la misma, por ejemplo, uno o más dominios extracelulares) de CD4 humano que es responsable de interactuar con el MHC II, dominios variables del

receptor de linfocitos T, dominios constantes del receptor de linfocitos T, o una combinación de los mismos, y en donde el correceptor de CD8 humanizado comprende las porciones extracelulares (o partes de las mismas, por ejemplo, dominios extracelulares) de CD8 $\alpha$  humano y CD8 $\beta$  humano que es responsable de interactuar con el MHC I, dominios variables del receptor de linfocitos T, dominios constantes del receptor de linfocitos T, o una combinación de los mismos;

(B) un TCR humanizado, en donde el roedor comprende, por ejemplo, en su genoma de estirpe germinal, un locus génico variable  $\alpha$  del receptor de linfocitos T (TCR) sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\alpha$  humano y al menos un segmento J $\alpha$  humano, unido operativamente a una secuencia génica constante del TCR $\alpha$  de roedor y/o un locus génico variable del TCR $\beta$  sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\beta$  humano, al menos un segmento D $\beta$  humano, y al menos un segmento J $\beta$  humano, unido operativamente a una secuencia génica constante del TCR $\beta$  de roedor y

(C) un complejo MHC II humanizado que se asocia al correceptor de CD4 humanizado y un complejo MHC I humanizado que se asocia al correceptor de CD8 humanizado, en donde el animal roedor comprende, por ejemplo, en su genoma de estirpe germinal, una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC II $\alpha$  quimérico humano/de roedor, una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC II $\beta$  quimérico humano/de roedor y una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC I quimérico humano/de roedor

en donde cada polipéptido del MHC quimérico comprende al menos una porción extracelular (o parte de la misma) de un polipéptido de HLA humano que, ya sea solo (por ejemplo, MHC I) o cuando forma complejo con otro polipéptido del MHC quimérico (por ejemplo, MHC II  $\alpha$  y MHC II  $\beta$ ) es capaz, respectivamente, de asociarse al correceptor de CD8 humanizado o el correceptor de CD4 humanizado y presentar el péptido en el contexto de HLA, por ejemplo, en donde un complejo MHC II humanizado comprende (i) un polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico humano/de roedor que comprende los dominios  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 de un polipéptido de HLA de clase II  $\alpha$  humano y los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido de HLA de clase II  $\alpha$  de roedor y (ii) un polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico humano/no humano comprende los dominios  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 de un polipéptido de HLA de clase II  $\beta$  humano, los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido de HLA de clase II  $\beta$  de roedor y (iii) un complejo MHC I humanizado comprende dominios  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3 de un polipéptido del MHC I humano y una  $\beta$ 2 microglobulina humana (o humanizada), en donde el roedor comprende además un locus de la  $\beta$ 2 microglobulina que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la  $\beta$ 2 microglobulina humana, o una porción de la misma.

En algunas realizaciones, la primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del correceptor de CD4 de linfocitos T quimérico está presente en un locus del correceptor de linfocitos T CD4 endógeno, y/o la segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del correceptor de CD8 $\alpha$  de linfocitos T quimérico está presente en un locus del correceptor de linfocitos T CD8 $\alpha$  endógeno y la tercera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del correceptor de CD8 $\beta$  de linfocitos T quimérico está presente en un locus del correceptor de linfocitos T CD8 $\beta$  endógeno. Los ejemplos adicionales incluyen un polipéptido de CD4 quimérico humano/de roedor codificado por el gen expuesto en la FIG. 5A (por ejemplo, en donde la porción humana del polipéptido del correceptor de linfocitos T CD4 quimérico humano/de roedor resultante comprende al menos dominios de Ig1 humana, Ig2 humana e Ig3 humana, también denominados respectivamente dominios D1, D2 y D3) y/o un correceptor de CD8 quimérico codificado por los genes expuestos en la FIG. 5B (por ejemplo, en donde la porción humana del correceptor de CD8 quimérico comprende toda o sustancialmente toda la porción extracelular de un polipéptido de CD8 humano (por ejemplo, CD8 $\alpha$  y/o CD8 $\beta$ ), incluyendo dominios  $\alpha$  y  $\beta$  similares a inmunoglobulina V (IgV) humana. En algunas realizaciones, la porción humana del polipéptido del correceptor de linfocitos T CD4 quimérico comprende uno o más dominios extracelulares de un polipéptido de CD4 humano (por ejemplo, D1, D2, D3, D4 o cualquier combinación de los mismos) y la porción de roedor del polipéptido del correceptor de linfocitos T CD4 quimérico comprende los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un correceptor de linfocitos T CD4 de roedor, la porción humana del polipéptido de CD8 $\alpha$  quimérico comprende un dominio extracelular (por ejemplo, un dominio similar a IgV) de un polipéptido de CD8 $\alpha$  humano y la porción de roedor del polipéptido de CD8 $\alpha$  quimérico comprende los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido de CD8 $\alpha$  de roedor, y/o la porción humana del polipéptido de CD8 $\beta$  comprende un dominio extracelular (por ejemplo, un dominio similar a IgV) del polipéptido de CD8 $\beta$  humano y la porción de roedor del polipéptido del correceptor de linfocitos T CD8 $\beta$  quimérico comprende los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido de CD8 $\beta$  de roedor.

En algunas realizaciones, la primera secuencia de ácido nucleico que codifica el MHC II  $\alpha$  humano (o humanizado) está presente en un locus del MHC II  $\alpha$  de roedor endógeno y la segunda secuencia de ácido nucleico que codifica el MHC II  $\beta$  humano (o humanizado) está presente en un locus del MHC II  $\beta$  de roedor endógeno, y/o la tercera secuencia de ácido nucleico que codifica el MHC I humano (o humanizado) está presente en un locus del MHC I de roedor endógeno. El polipéptido del MHC II $\alpha$  humano (o humanizado) comprende la porción extracelular (o parte de la misma) de un polipéptido de HLA de clase II $\alpha$  humano, el polipéptido del MHC II $\beta$  humano (o humanizado) comprende la porción extracelular (o parte de la misma) de un polipéptido de HLA de clase I $\beta$  humano y/o el polipéptido del MHC I humano (o humanizado) comprende la porción extracelular (o parte de la misma) de un polipéptido de HLA de clase I humano. En algunas realizaciones, el polipéptido del MHC II  $\alpha$  humanizado comprende dominios  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 del MHC II humano, el polipéptido del MHC II  $\beta$  humanizado comprende dominios  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 del MHC II humano y/o el polipéptido del MHC I humanizado comprende dominios  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3 del MHC I humano. En algunas realizaciones, la primera

secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico humano/de roedor se expresa bajo el control regulador de elementos promotores y reguladores del MHC II  $\alpha$  de roedor endógeno, la segunda secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico humano/no humano se expresa bajo el control regulador de elementos promotores y reguladores del MHC II  $\beta$  de roedor endógeno, y/o la tercera secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido del MHC I quimérico humano/de roedor se expresa bajo el control regulador de elementos promotores y reguladores de un MHC I no humano endógeno. En realizaciones adicionales, una porción de roedor del polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico humano/de roedor comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del MHC II  $\alpha$  de roedor endógeno, una porción de roedor del polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico humano/de roedor comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del MHC II  $\beta$  de roedor endógeno y/o una porción de roedor del polipéptido del MHC I quimérico humano/no humano comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del MHC I de roedor endógeno. Las realizaciones incluyen roedores en donde la porción humana de las proteínas del complejo MHC II quimérico humano/de roedor deriva de las proteínas HLA de clase II humanas correspondientes seleccionadas del grupo que consiste en HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP y/o en donde la porción humana del tercer polipéptido del MHC I quimérico humano/de roedor deriva de HLA-A humano, HLA-B humano o HLA-C humano. Como ejemplos no limitantes, en algunas realizaciones, el polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico comprende la porción extracelular, o una parte de la misma, de una proteína HLA-DR $\alpha$ , una proteína HLA-DQ  $\alpha$  o una proteína HLA-DP  $\alpha$ , el polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico comprende la porción extracelular, o una parte de la misma, de una proteína HLA-DR $\beta$ , una proteína HLA-DQ  $\beta$  o una proteína HLA-DP  $\beta$ , y/o el polipéptido del MHC I quimérico comprende la porción extracelular, o una parte de la misma, de una proteína HLA-A humana, una proteína HLA-B humana o una proteína HLA-C humana. También se proporcionan roedores, en donde la porción humana de las proteínas MHC II quiméricas de humano/de roedor derivada de las proteínas HLA-DR humanas correspondientes, por ejemplo, la porción humana del polipéptido del MHC II  $\alpha$  humano/de roedor comprende los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de la cadena  $\alpha$  de HLA-DR2 y la porción humana del polipéptido del MHC II  $\beta$  humano/de roedor comprende los dominios  $\beta 1$  y  $\beta 2$  de la cadena  $\beta$  de HLA-DR2 y/o en donde la porción humana del polipéptido del MHC I deriva de un polipéptido de HLA-A humano, por ejemplo, la porción humana del polipéptido del MHC I humano/de roedor comprende los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de un polipéptido de HLA-A2 humano, por ejemplo, los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de un polipéptido de HLA-A2.1 humano. También se proporcionan animales no humanos en donde las porciones no humanas del complejo MHC II derivan de una secuencia codificante de H-2E murino y/o en donde las porciones no humanas del polipéptido del MHC I derivan de una secuencia codificante de H-2K murino. Por ejemplo, el polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico comprende los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido de H-2E  $\alpha$  murino, el polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico comprende los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido de H-2E  $\beta$  murino, y el polipéptido del MHC I quimérico comprende los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido de H-2K murino.

En algunas realizaciones, el locus génico variable del TCR $\alpha$  sin reordenar está presente en un locus génico variable del TCR $\alpha$  endógeno y el locus génico variable del TCR $\beta$  sin reordenar está presente en un locus génico variable del TCR $\beta$  endógeno. En algunos aspectos, el locus génico variable del TCR $\alpha$  sin reordenar comprende un repertorio completo de segmentos del gen V $\alpha$  humano sin reordenar y un repertorio completo de segmentos del gen J $\alpha$  humano sin reordenar y/o el locus génico variable del TCR $\beta$  sin reordenar comprende un repertorio completo de segmentos del gen V $\beta$  humano sin reordenar, un repertorio completo de segmentos del gen D $\beta$  humano sin reordenar y un repertorio completo de segmentos del gen J $\beta$  humano sin reordenar. En algunas realizaciones, los segmentos de los genes V $\alpha$  y J $\alpha$  humanos sin reordenar se reordenan para formar una secuencia V $\alpha$ /J $\alpha$  humana reordenada y/o los segmentos de los genes V $\beta$ , D $\beta$  y J $\beta$  humanos sin reordenar se reordenan para formar una secuencia V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$  humana reordenada. En algunas realizaciones, un roedor como se desvela en el presente documento expresa un receptor de linfocitos T que comprende una región variable del TCR $\alpha$  humano y/o una región variable del TCR $\beta$  humano en la superficie de un linfocito T. En algunas realizaciones, los segmentos V $\alpha$  y J $\alpha$  no humanos endógenos son incapaces de reordenarse para formar una secuencia V $\alpha$ /J $\alpha$  reordenada y/o los segmentos V $\beta$ , D $\beta$ , y J $\beta$  no humanos endógenos son incapaces de reordenarse para formar una secuencia V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$  reordenada, por ejemplo, el animal puede carecer de un locus variable del TCR $\alpha$  no humano endógeno funcional y/o el animal puede carecer de un locus variable del TCR $\beta$  no humano endógeno funcional, por ejemplo, el animal comprende (a) una supresión de todos o sustancialmente todos los segmentos del gen V $\alpha$  endógeno funcional, (b) una supresión de todos o sustancialmente todos los segmentos del gen J $\alpha$  endógeno funcional, (c) una supresión de todos o sustancialmente todos los segmentos del gen V $\beta$  endógeno funcional, (d) una eliminación de todos o sustancialmente todos los segmentos del gen D $\beta$  endógeno funcional, (e) una supresión de todos o sustancialmente todos los segmentos del gen J $\beta$  endógeno funcional y/o (f) una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el locus variable del TCR $\alpha$  no humano endógeno carece de todos o sustancialmente todos los segmentos del gen V $\alpha$  endógeno funcional y/o carece de todos o sustancialmente todos los segmentos del gen J $\alpha$  endógeno funcional; y/o el locus variable del TCR $\beta$  no humano endógeno (a) carece de todos o sustancialmente todos los segmentos del gen V $\beta$  endógeno funcional, (b) carece de todos o sustancialmente todos los segmentos del gen D $\beta$  endógeno funcional, (c) carece de todos o sustancialmente todos los segmentos del gen J $\beta$  endógeno funcional o (d) cualquier combinación de (a), (b) y (c).

En algunas realizaciones, la primera, la segunda y/o la tercera secuencias de nucleótidos que codifican respectivamente los polipéptidos de los correceptores CD4, CD8 $\alpha$  y/o CD8  $\beta$  de linfocitos T quiméricos están presentes en los loci de correceptores de linfocitos T endógenos, por ejemplo, los loci de correceptores CD4, CD8 $\alpha$  y/o CD8  $\beta$  endógenos, respectivamente; el locus génico variable del TCR $\alpha$  sin reordenar está presente en un locus génico

variable del TCR $\alpha$  endógeno; el locus génico variable del TCR $\beta$  sin reordenar está presente en un locus génico variable del TCR $\beta$  endógeno; y/o la primera, la segunda y/o la tercera secuencias de ácido nucleico que codifican respectivamente los polipéptidos del MHC II  $\alpha$ , MHC II  $\beta$  y/o MHC I quiméricos están presentes en los loci de MHC endógenos; por ejemplo, los loci de MHC II  $\alpha$ , MHC II  $\beta$  y/o MHC I, respectivamente. En algunas realizaciones, la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican el correceptor o correceptores de linfocitos T quiméricos, el locus génico variable del TCR $\alpha$  sin reordenar, el locus génico variable del TCR $\beta$  sin reordenar y/o la secuencia o secuencias de ácido nucleico que codifican la molécula o moléculas del MHC quimérico pueden unirse operativamente a un promotor y a secuencias reguladoras de roedor. Por ejemplo, la primera secuencia de nucleótidos puede expresarse bajo el control regulador de elementos promotores y reguladores de CD4 de roedor endógeno, la segunda secuencia de nucleótidos puede expresarse bajo el control regulador de elementos promotores y reguladores de CD8 $\alpha$  de roedor endógeno, y/o la tercera secuencia de nucleótidos puede expresarse bajo el control regulador de elementos promotores y reguladores de CD8 $\beta$  de roedor endógeno; el locus génico variable del TCR $\alpha$  sin reordenar puede expresarse bajo el control regulador de elementos reguladores y promotores del TCR $\alpha$  (variable) endógeno y el locus génico variable del TCR $\beta$  sin reordenar puede expresarse bajo el control regulador de elementos reguladores y promotores del TCR $\beta$  (variable) endógeno; la primera secuencia de ácido nucleico puede expresarse bajo el control regulador de elementos promotores y reguladores del MHC II  $\alpha$  de roedor endógeno, la segunda secuencia de ácido nucleico puede expresarse bajo el control regulador de un promotor y de elementos reguladores del MHC II  $\beta$  de roedor endógeno, y la tercera secuencia de ácido nucleico puede expresarse bajo el control regulador de elementos promotores y reguladores de un MHC I de roedor endógeno.

En algunas realizaciones, una secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o partes de la misma, por ejemplo, D1, D2, D3 y/o D4) del polipéptido de CD4 humano reemplaza una secuencia que codifica la porción extracelular (o partes de la misma, por ejemplo, D1, D2, D3 y/o D4) de un polipéptido del correceptor de CD4 de roedor (ratón) endógeno, y puede estar unida operativamente a secuencias codificantes de dominios transmembrana y citoplasmáticos de CD4 de roedor (ratón) endógeno, en el locus del correceptor de CD4 de roedor (ratón) endógeno; una secuencia de nucleótidos que codifica la totalidad o parte de la porción extracelular de un polipéptido de CD8 $\alpha$  humano reemplaza una secuencia que codifica la totalidad o parte de una porción extracelular de un polipéptido de CD8 $\alpha$  de linfocitos T de roedor (ratón) endógeno, y puede estar unida operativamente a secuencias codificantes de dominios transmembrana y citoplasmáticos de CD8 $\alpha$  de roedor (ratón) endógeno, en el locus de CD8 $\alpha$  de roedor (ratón) endógeno; una secuencia de nucleótidos que codifica la totalidad o parte del dominio extracelular de un polipéptido de CD8 $\beta$  humano reemplaza una secuencia que codifica la totalidad o parte de un dominio extracelular de un polipéptido de CD8 $\beta$  de linfocitos T de roedor (ratón) endógeno y puede estar unida operativamente a secuencias codificantes de dominios transmembrana y citoplasmáticos de CD8 $\beta$  de roedor endógeno, en el locus de CD8 $\beta$  endógeno; un locus génico variable del TCR $\alpha$  sin reordenar reemplaza uno o más segmentos de los genes V $\alpha$  y/o J $\alpha$  endógenos en un locus génico variable del TCR $\alpha$  de roedor (ratón) endógeno; un locus génico variable del TCR $\beta$  sin reordenar reemplaza uno o más segmentos de los genes V $\beta$ , D $\beta$  y/o J $\alpha$  endógenos en un locus génico variable del TCR $\beta$  de roedor (ratón) endógeno; una secuencia de ácido nucleico que codifica la porción extracelular (o partes de la misma, por ejemplo, los dominios  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2) de un polipéptido del MHC II  $\alpha$  humano reemplaza una secuencia que codifica la porción extracelular (o partes de la misma, por ejemplo, los dominios  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2) de un polipéptido del MHC II  $\alpha$  no humano (ratón) endógeno, y puede estar unida operativamente a secuencias codificantes de dominios transmembrana y citoplasmáticos del MHC II  $\alpha$  de roedor (ratón) endógeno, en un locus del MHC II  $\alpha$  de roedor (ratón) endógeno; una secuencia de ácido nucleico que codifica la porción extracelular (o partes de la misma, por ejemplo, los dominios  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2) de un polipéptido del MHC II  $\beta$  humano reemplaza una secuencia que codifica la porción extracelular (o partes de la misma, por ejemplo, los dominios  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2) de un polipéptido del MHC II  $\beta$  de roedor (ratón) endógeno, y puede estar unida operativamente a secuencias codificantes de dominios transmembrana y citoplasmáticos del MHC II  $\beta$  de roedor (ratón) endógeno, en un locus del MHC II  $\beta$  de roedor (ratón) endógeno; y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica la porción extracelular (o partes de la misma, por ejemplo, los dominios  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y/o  $\alpha$ 3) de un polipéptido del MHC I humano reemplaza una secuencia que codifica la porción extracelular (o partes de la misma, por ejemplo, los dominios  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y/o  $\alpha$ 3) de un polipéptido del MHC I de roedor (ratón) endógeno, y puede estar unida operativamente a secuencias codificantes de dominios transmembrana y citoplasmáticos del MHC I de roedor (ratón) endógeno, en un locus del MHC I de roedor (ratón) endógeno.

En algunas realizaciones, un animal roedor modificado genéticamente como se desvela en el presente documento no expresa un correceptor de CD4 de linfocitos T no humano endógeno funcional a partir de su locus endógeno, no expresa un correceptor de CD8 de linfocitos T de roedor endógeno funcional a partir de su locus de CD8 endógeno, no expresa un dominio variable del TCR $\alpha$  funcional a partir de un locus variable del TCR $\alpha$  endógeno, no expresa un dominio variable del TCR $\beta$  funcional a partir de un locus variable del TCR $\beta$  endógeno, no expresa un dominio extracelular de un complejo MHC II endógeno a partir de un locus del MHC II endógeno (por ejemplo, en una superficie celular) y/o no expresa un dominio extracelular de un polipéptido del MHC I endógeno a partir de un locus del MHC I endógeno (por ejemplo, en la superficie celular).

Cualquier animal no humano desvelado en el presente documento puede comprender además un locus de la  $\beta$ 2 microglobulina que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la  $\beta$ 2 microglobulina humana o humanizada, en donde el animal no humano expresa el polipéptido de la  $\beta$ 2 microglobulina humano o humanizado. En algunas realizaciones, el roedor no expresa un polipéptido de la  $\beta$ 2 microglobulina de roedor endógeno funcional a partir de un locus de la  $\beta$ 2 microglobulina de roedor endógeno. En algunas realizaciones, el

locus de la  $\beta 2$  microglobulina está unido operativamente a elementos reguladores de la  $\beta 2$  microglobulina de roedor endógenos. En una realización, el locus de la  $\beta 2$  microglobulina comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en el exón 2, el exón 3 y el exón 4 (por ejemplo, del exón 2 al exón 4) de un gen de la  $\beta 2$  microglobulina humano y, opcionalmente, el locus de la  $\beta 2$  microglobulina comprende además una secuencia de nucleótidos expuesta en el exón 1 de un gen de la  $\beta 2$  microglobulina de roedor.

En el presente documento también se proporciona un ratón que expresa polipéptidos de correceptores de CD4, CD8 $\alpha$  y CD8 $\beta$  de linfocitos T quiméricos humanos/murinos, que comprenden cada uno respectivamente dominios transmembrana y citoplasmáticos de CD4, CD8 $\alpha$  y CD8 $\beta$  murinos; un receptor de linfocitos T que comprende una región variable del TCR $\alpha$  humano y una región variable del TCR $\beta$  humano en la superficie de un linfocito T; polipéptidos del MHC II $\alpha$ , MHC II $\beta$  y MHC I quiméricos humanos/murinos, que comprenden cada uno respectivamente dominios extracelulares de un polipéptido del MHC II  $\alpha$  humano (dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de HLA de clase II humano), el MHC II  $\beta$  (dominios  $\beta 1$  y  $\beta 2$  de HLA de clase II humano) y el MHC I (por ejemplo, dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de HLA de clase II humano); y un polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina humano o humanizado. En una realización, en el presente documento se proporcionan roedores, por ejemplo, ratones, en donde la primera secuencia de ácido nucleico codifica una cadena  $\alpha$  de un polipéptido de HLA-DR/H-2E quimérico humano/murino, la segunda secuencia de nucleótidos codifica una cadena  $\beta$  de un polipéptido de HLA-DR/H-2E quimérico y la tercera secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido de HLA-A/H-2K quimérico humano/murino, y en donde el ratón expresa proteínas HLA-A/H-2K y HLA-DR/H-2E.

En el presente documento también se proporciona un roedor que comprende un sistema inmunitario de linfocitos T sustancialmente humanizados, por ejemplo, en donde el sistema inmunitario de linfocitos T sustancialmente humanizados genera una respuesta inmunitaria de linfocitos T sustancialmente humanizados contra un antígeno. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria de linfocitos T sustancialmente humanizados comprende linfocitos T activados que expresan dominios variables del receptor de linfocitos T (TCR) humanos que reconocen el antígeno presentado en el contexto de dominios extracelulares del antígeno leucocitario humano (HLA) y/o células presentadoras de antígeno que presentan el antígeno en el contexto de dominios extracelulares de HLA. En algunas realizaciones, el sistema inmunitario de linfocitos T sustancialmente humanizados comprende: (a) un linfocito T de roedor que expresa un polipéptido del correceptor de linfocitos T que comprende un dominio correceptor de linfocitos T humanos que se une a una molécula de HLA humano y/o un receptor de linfocitos T (TCR) que comprende un dominio variable del TCR que está codificado por al menos un segmento génico de la región variable del TCR humana; y (b) una célula presentadora de antígeno de roedor que presenta antígeno en el contexto de HLA humano y activa el linfocito T de roedor.

En el presente documento también se desvelan métodos de generación y uso de los animales no humanos. Generalmente, los métodos de generación de un animal no humano modificado genéticamente como se desvela en el presente documento comprenden (a) introducir en el genoma del animal no humano una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del correceptor de linfocitos T quimérico humano/no humano (por ejemplo, un polipéptido de CD4 quimérico), y/o una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un segundo polipéptido del correceptor de linfocitos T quimérico humano/no humano (por ejemplo, un polipéptido de CD8 $\alpha$  quimérico) y una tercera secuencia de nucleótidos que codifica un tercer polipéptido del correceptor de linfocitos T quimérico humano/no humano (por ejemplo, un polipéptido de CD8 $\beta$  quimérico), en donde una porción no humana de cada polipéptido del correceptor de linfocitos T quimérico comprende al menos dominios transmembrana y citoplasmáticos de un correceptor de linfocitos T no humano, y en donde una porción humana de cada polipéptido quimérico comprende una porción extracelular (o parte de la misma), por ejemplo, uno o más dominios de un correceptor de linfocitos T humano; (b) insertar en el genoma del animal no humano un locus génico variable  $\alpha$  del receptor de linfocitos T (TCR) sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\alpha$  humano y al menos un segmento J $\alpha$  humano, unido operativamente a una secuencia génica constante del TCR $\alpha$  no humano y/o un locus génico variable del TCR $\beta$  sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\beta$  humano, al menos un segmento D $\beta$  humano, y al menos un segmento J $\beta$  humano, unido operativamente a una secuencia génica constante del TCR $\beta$  no humano; y opcionalmente (c) colocar en el genoma una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido del MHC quimérico humano/no humano (por ejemplo, un polipéptido del MHC II $\alpha$  quimérico), una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido del MHC quimérico humano/no humano (por ejemplo, un polipéptido del MHC II $\beta$  quimérico) y/o una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un tercer polipéptido del MHC quimérico humano/no humano (por ejemplo, un polipéptido del MHC I quimérico) y/o (d) añadir al genoma del animal no humano un locus de la  $\beta 2$  microglobulina que codifica un polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina humano o humanizado. En algunas realizaciones, la primera secuencia de nucleótidos codifica la porción extracelular, o una parte de la misma, de CD4 humano unida operativamente a al menos dominios transmembrana y citoplasmáticos de un correceptor de CD4 no humano, la segunda secuencia de nucleótidos codifica la porción extracelular, o una parte de la misma, de CD8 $\alpha$  humano y al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un CD8 $\alpha$  no humano, la tercera secuencia de nucleótidos codifica la porción extracelular, o una parte de la misma, de CD8 $\beta$  humano y al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de CD8 $\beta$  no humano, la primera secuencia de ácido nucleico codifica la porción extracelular (o parte de la misma) de un polipéptido de HLA de clase II  $\alpha$  humano y al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del MHC II  $\alpha$  no humano, la segunda secuencia de ácido nucleico codifica la porción extracelular (o parte de la misma) de un polipéptido de HLA de clase II  $\beta$  humano y al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del MHC II  $\beta$  no humano, la tercera secuencia de ácido

nucleico codifica la porción extracelular (o parte de la misma) de un polipéptido de HLA de clase I humano y los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del MHC I no humano, y el locus de la  $\beta 2$  microglobulina comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en los exones 2 a 4 del gen de la  $\beta 2$  microglobulina humano, por ejemplo, secuencias de nucleótidos expuestas en los exones 2, 3 y 4 del gen de la  $\beta 2$  microglobulina humano.

5 Los métodos de generación de roedores incluyen realizaciones en donde (a) introducir la primera, la segunda y/o la tercera secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido o polipéptidos de los correceptores de linfocitos T quiméricos en el genoma del animal no humano comprenden reemplazar en un locus de CD4 endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD4 de roedor endógeno con una secuencia de  
10 nucleótidos que codifica un polipéptido de CD4 quimérico humano/de roedor, y/o reemplazar en un locus de CD8 $\alpha$  endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8 $\alpha$  de roedor endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8 $\alpha$  quimérico humano/de roedor y reemplazar en un locus de CD8 $\beta$  endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8 $\beta$  de roedor endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8 $\beta$  quimérico humano/de roedor; (b) insertar el locus del TCR $\alpha$  sin  
15 reordenar y/o el locus del TCR $\beta$  sin reordenar en el genoma del animal comprende reemplazar en un locus génico variable del TCR $\alpha$  de roedor endógeno con un locus génico variable del TCR $\alpha$  humanizado sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\alpha$  humano y al menos un segmento J $\alpha$  humano para generar un locus génico variable del TCR $\alpha$  humanizado, en donde el locus génico variable del TCR $\alpha$  humanizado está unido operativamente a la región constante del TCR $\alpha$  de roedor endógeno y/o reemplazar un locus génico variable del TCR $\beta$  de roedor endógeno con un locus  
20 génico variable del TCR $\beta$  humanizado sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\beta$  humano, al menos un segmento D $\beta$  humano y al menos un segmento J $\beta$  humano para generar un locus génico variable del TCR $\beta$  humanizado, en donde el locus génico variable del TCR $\beta$  humanizado está unido operativamente a la región constante del TCR $\beta$  de roedor endógeno; (c) colocar la primera, la segunda y/o la tercera o secuencia o secuencias de ácido  
25 nucleico que codifican el polipéptido o polipéptidos quiméricos del MHC en el genoma del roedor comprende reemplazar en un locus del MHC II de roedor endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un complejo MHC II de roedor con una secuencia de nucleótidos que codifica un complejo MHC II quimérico humano/de roedor y reemplazar en un locus del MHC I de roedor endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del  
30 MHC I de roedor con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del MHC I quimérico humano/de roedor y/o (d) añadir el locus de la  $\beta 2$  microglobulina que codifica un polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina humano o humanizado en el genoma de un roedor que comprende reemplazar en el locus de la  $\beta 2$  microglobulina no humano endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina de roedor con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina humano o humanizado.

En algunas realizaciones, (a) introducir la primera, la segunda y/o la tercera secuencias de nucleótidos en el genoma  
35 del animal roedor comprende, respectivamente, (i) reemplazar en un locus de CD4 endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido de CD4 de roedor endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido de CD4 humano en unión operativa con secuencias que codifican los dominios transmembrana y citoplasmáticos de CD4 de roedor endógeno, (ii) reemplazar en un locus de CD8 $\alpha$  endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica la  
40 porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido de CD8 $\alpha$  de roedor endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido de CD8 $\alpha$  humano en unión operativa con secuencias que codifican los dominios transmembrana y citoplasmáticos de CD8 $\alpha$  de roedor endógeno y/o (iii) reemplazar en un locus de CD8 $\beta$  endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido de CD8 $\beta$  de roedor endógeno con una secuencia de nucleótidos que  
45 codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido de CD8 $\beta$  humano en unión operativa con secuencias que codifican los dominios transmembrana y citoplasmáticos de CD8 $\beta$  de roedor endógeno; (b) insertar el locus del TCR $\alpha$  sin reordenar y/o el locus del TCR $\beta$  sin reordenar en el genoma del animal comprende, respectivamente, (i) reemplazar un locus génico variable del TCR $\alpha$  de roedor endógeno con un locus génico variable del TCR $\alpha$  humanizado sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\alpha$  humano y al menos un segmento J $\alpha$   
50 humano para generar un locus génico variable del TCR $\alpha$  humanizado, en donde el locus génico variable del TCR $\alpha$  humanizado está unido operativamente a la región constante del TCR $\alpha$  de roedor endógeno y/o (ii) reemplazar un locus génico variable del TCR $\beta$  de roedor endógeno con un locus génico variable del TCR $\beta$  humanizado sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\beta$  humano, al menos un segmento D $\beta$  humano y al menos un segmento J $\beta$  humano para generar un locus génico variable del TCR $\beta$  humanizado, en donde el locus génico variable del TCR $\beta$   
55 humanizado está unido operativamente a la región constante del TCR $\beta$  de roedor endógeno; (c) colocar la primera, la segunda y/o la tercera secuencias de ácido nucleico en el genoma del animal roedor comprende, respectivamente, (i) reemplazar en un locus del MHC II  $\alpha$  de roedor endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido del MHC II  $\alpha$  de roedor con una secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido de HLA de clase II  $\alpha$  humano en unión  
60 operativa con secuencias que codifican los dominios transmembrana y citoplasmáticos del MHC II  $\alpha$  de roedor endógeno, (ii) reemplazar en un locus del MHC II  $\beta$  de roedor endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido del MHC II  $\beta$  de roedor con una secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido de HLA de clase II  $\beta$  humano en unión operativa con secuencias que codifican los dominios transmembrana y citoplasmáticos del MHC II  
65  $\beta$  no humano endógeno y/o (iii) reemplazar en un locus del MHC I de roedor endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido del MHC I de roedor con una secuencia



de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido de HLA de clase I humano en unión operativa con secuencias que codifican los dominios transmembrana y citoplasmáticos del MHC I de roedor endógeno; y/o reemplazar en un locus de la  $\beta 2$  microglobulina endógeno una secuencia de nucleótidos expuesta en el exón 2-exón 4 con una secuencia de nucleótidos que comprende los exones 2, 3 y 4 de un gen de la  $\beta 2$  microglobulina humano.

En una realización, la etapa de introducción comprende reemplazar en un primer roedor en un locus de CD4 endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD4 de roedor endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD4 quimérico humano/de roedor, reemplazar en un segundo roedor en un locus de CD8 $\alpha$  endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8 $\alpha$  de roedor endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8 $\alpha$  quimérico humano/de roedor y reemplazar en un locus de CD8 $\beta$  endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8 $\beta$  de roedor endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8 $\beta$  quimérico humano/de roedor. En algunas realizaciones, la etapa de introducción comprende reemplazar en un primer roedor en un locus de CD4 endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido de CD4 de roedor endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido de CD4 humano en unión operativa con secuencias que codifican los dominios transmembrana y citoplasmáticos de CD4 de roedor endógeno, reemplazar en un segundo roedor en un locus de CD8 $\alpha$  endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido de CD8 $\alpha$  de roedor endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido de CD8 $\alpha$  humano en unión operativa con secuencias que codifican los dominios transmembrana y citoplasmáticos de CD8 $\alpha$  de roedor endógeno y reemplazar en un locus de CD8 $\beta$  endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido de CD8 $\beta$  de roedor endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido de CD8 $\beta$  humano en unión operativa con secuencias que codifican los dominios transmembrana y citoplasmáticos de CD8 $\beta$  de roedor endógeno. Como se desvela en el presente documento, las etapas de reemplazo pueden realizarse simultáneamente o en cualquier orden.

La etapa de inserción puede comprender reemplazar en un tercer animal no humano un locus génico variable del TCR $\alpha$  no humano endógeno con un locus génico variable del TCR $\alpha$  humanizado sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\alpha$  humano y al menos un segmento J $\alpha$  humano para generar un locus génico variable del TCR $\alpha$  humanizado, en donde el locus génico variable del TCR $\alpha$  humanizado está unido operativamente a una región constante del TCR $\alpha$  endógena no humana; reemplazar en un cuarto animal no humano un locus génico variable del TCR $\beta$  no humano endógeno con un locus génico variable del TCR $\beta$  humanizado sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\beta$  humano, al menos un segmento D $\beta$  humano y al menos un segmento J $\beta$  humano para generar un locus génico variable del TCR $\beta$  humanizado, en donde el locus génico variable del TCR $\alpha$  humanizado está unido operativamente a una región constante del TCR $\alpha$  endógena no humana. En algunas realizaciones, las etapas de reemplazo se realizan simultáneamente o en cualquier orden.

La etapa de colocación puede comprender, sin ningún orden en particular, reemplazar en un quinto animal no humano en un locus del MHC II no humano endógeno una o más secuencias de nucleótidos que codifican un complejo MHC II no humano con una o más secuencias de nucleótidos que codifican un complejo MHC II quimérico humano/no humano; y reemplazar en el quinto animal no humano en un locus del MHC I no humano endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del MHC I no humano con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del MHC I quimérico humano/no humano, la etapa de colocación puede comprender reemplazar en un quinto animal no humano en un locus del MHC II  $\alpha$  no humano endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido del MHC II  $\alpha$  no humano con una secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido del MHC II  $\alpha$  humano en unión operativa con secuencias que codifican los dominios transmembrana y citoplasmáticos del MHC II  $\alpha$  no humano endógeno y reemplazar en un locus del MHC II  $\beta$  no humano endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido del MHC II  $\beta$  no humano con una secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido del MHC II  $\beta$  humano en unión operativa con secuencias que codifican los dominios transmembrana y citoplasmáticos del MHC II  $\beta$  no humano endógeno; y reemplazar en un locus del MHC I no humano endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido del MHC I no humano con una secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular (o una parte de la misma) de un polipéptido del MHC I humano en unión operativa con secuencias que codifican los dominios transmembrana y citoplasmáticos del MHC I no humano endógeno en el quinto animal no humano. En algunas realizaciones, las etapas de reemplazo pueden realizarse simultáneamente o en cualquier orden.

La etapa de adición puede comprender reemplazar en un sexto animal no humano en el locus de la  $\beta 2$  microglobulina no humano endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina no humano con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina humano o humanizado. En algunas realizaciones, el polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina humano o humanizado está codificado por la secuencia de nucleótidos expuesta en el exón 2, el exón 3 y el exón 4 del gen de la  $\beta 2$  microglobulina humana.

En el presente documento también se desvelan métodos en donde se introduce una primera, una segunda y/o una tercera secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido o polipéptidos de los correceptores de linfocitos T quiméricos; se inserta el locus del TCR $\alpha$  y/o el locus del TCR $\beta$  sin reordenar; se colocan la primera, la segunda y/o la tercera secuencia o secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido o polipéptidos del MHC quimérico; y/o el locus de la  $\beta$ 2 microglobulina se añade reproduciendo un animal no humano que comprende una o más de las modificaciones genéticas como se describen en el presente documento con otro o más animales no humanos de la misma especie que comprenden las modificaciones genéticas restantes. También se desvela la reproducción, en cualquier orden, del primer, segundo, tercer, cuarto, quinto y sexto animales no humanos como se ha descrito anteriormente.

Los métodos desvelados en el presente documento pueden comprender la recombinación homóloga en células madre embrionarias (ES, por sus siglas en inglés) no humanas. Pueden usarse métodos desvelados en el presente documento para generar ratones como se desvela en el presente documento. Pueden generarse animales no humanos que expresan polipéptidos de los correceptores de linfocitos T CD4, CD8 $\alpha$  y/o CD8 $\beta$  humanos/no humanos quiméricos, proteínas TCR  $\alpha/\beta$  humanas (o humanizadas) y complejo MHC II y MHC I quiméricos (con  $\beta$ 2 microglobulina humana o humanizada) (a) introduciendo primero cada gen humano (o humanizado) individual por recombinación homóloga en células ES individuales respectivamente y generando cada animal no humano individual a partir de dichas células ES, y reproduciendo posteriormente cada animal no humano generado en cualquier orden, (b) introduciendo todos los genes humanos (o humanizados) mediante recombinación homóloga secuencial en una única célula ES y después generar un animal no humano a partir de dicha célula ES o (c) una combinación de recombinación homóloga secuencial en algunos loci en células ES y reproducción. Los animales como se desvelan en el presente documento también pueden generarse reproduciendo la descendencia de la reproducción inicial con otros animales, según corresponda. La reproducción y/o la recombinación homóloga pueden realizarse en cualquier orden preferido.

También se desvelan métodos de aislamiento de dominios variables del TCR humanos específicos para un antígeno de un animal no humano que comprenden aislar de un animal no humano proporcionado en el presente documento o elaborado de acuerdo con un método desvelado en el presente documento un linfocito T o proteína TCR que se une al antígeno. Los métodos pueden comprender además identificar un primer y/o segundo ácido nucleico que codifica los dominios variables del TCR $\alpha$  y/o TCR $\beta$  que se une al antígeno y/o cultivar una célula que comprende uno o más vectores en condiciones suficientes para la expresión del vector o vectores, en donde el vector comprende un tercer y/o cuarto ácido nucleico respectivamente idéntico o sustancialmente idéntico al primer y/o segundo ácido nucleico, y en donde el tercer y/o cuarto ácido nucleico se clona en fase con, por ejemplo, un gen de la región constante del TCR humana, por ejemplo, un gen de la región constante del TCR $\alpha$  y/o un gen de la región constante del TCR $\beta$ , respectivamente. También se desvela tejidos y células que comprenden las modificaciones genéticas que se desvelan en el presente documento (que pueden incluir genes de la región variable del TCR $\alpha$  y/o TCR $\beta$  humanos reordenados), y ácidos nucleicos que codifican dichos dominios variables del TCR humano expresados por dichos tejidos o células aisladas de un animal no humano modificado como se describe en el presente documento. También se incluyen (1) ácidos nucleicos recombinantes, por ejemplo, vectores de expresión, que comprenden las secuencias de ácido nucleico que codifican un dominio variable del TCR humano como se desvela en el presente documento, por ejemplo, un gen de la región variable del TCR $\alpha$  humano reordenado o del TCR $\beta$  humano reordenado, clonado en fase con un gen de la región constante del TCR humana adecuado, por ejemplo, un gen de la región constante del TCR $\alpha$  o un gen de la región constante del TCR $\beta$ , respectivamente, (2) células hospedadoras que comprenden dichos ácidos nucleicos (por ejemplo, vectores de expresión) y (3) el TCR expresado por las células hospedadoras. Los ácidos nucleicos recombinantes desvelados en el presente documento comprenden un gen de la región variable del TCR $\delta$  humano reordenado o un gen de la región variable del TCR $\gamma$ , por ejemplo, derivado de un animal no humano modificado genéticamente como se desvela en el presente documento o un tejido aislado del mismo, clonado en fase con un gen de la región constante del TCR $\delta$  humano o un gen de la región constante del TCR $\gamma$ , respectivamente.

También se desvela un método de generación de una respuesta de linfocitos T humanizados en un animal no humano, comprendiendo el método en general inmunizar a un animal no humano, un animal no humano modificado genéticamente o que tiene un sistema inmunitario de linfocitos T sustancialmente humanizados como se describe en el presente documento, con un antígeno, por ejemplo, un antígeno humano, por ejemplo, un antígeno tumoral humano, un patógeno bacteriano humano, un patógeno vírico humano, etc. En algunas realizaciones, el animal no humano inmunizado expresa al menos el 50 % de todos los segmentos del gen del TCRV $\alpha$  humano funcional y/o al menos el 50 % de todos los segmentos del gen del TCRV $\beta$  humano funcional y/o comprende todos o sustancialmente todos los segmentos del gen del TCRV $\alpha$  humano funcional y/o todos o sustancialmente todos los segmentos funcionales del gen del TCRV $\beta$  humano.

También se desvelan métodos *in vitro* de aislamiento del TCR humano específico para un antígeno, que generalmente comprenden detectar la activación de una primera célula de un animal no humano después de (a) el contacto con una segunda célula de un animal no humano y (b) la incubación con el antígeno; en donde la primera célula expresa un correceptor de linfocitos T quimérico humano/no humano y una o ambas de (i) una cadena de TCR $\alpha$  quimérica humana/no humana y (ii) una cadena de TCR $\beta$  quimérica humana/no humana, y en donde la segunda célula expresa un polipéptido del MHC quimérico humano/no humano. Los métodos pueden comprender además aislar un TCR de la primera célula o ácidos nucleicos que lo codifican.

En los métodos *in vitro* desvelados en el presente documento, el antígeno puede ser un antígeno tumoral, un antígeno vírico, un autoantígeno o un antígeno bacteriano. El animal no humano es un roedor, por ejemplo, una rata o un ratón. En el presente documento también se desvela un tejido, un linfocito T, un TCR (por ejemplo, un TCR soluble), o un ácido nucleico que codifica todo o parte del TCR que se aísla de un animal no humano modificado genéticamente o que tiene un sistema inmunitario de linfocitos T sustancialmente humanizado como se describe en el presente documento, un hibridoma o cuádrima derivado de un linfocito T de este tipo.

También se desvelan composiciones, por ejemplo, que comprenden una primera y una segunda célula de un animal no humano; en donde la primera célula expresa un correceptor de linfocitos T quimérico humano/no humano y, opcionalmente, una o ambas de (i) una cadena de TCR $\alpha$  quimérico humano/no humano y (ii) una cadena de TCR $\beta$  quimérico humano/no humano, y en donde la segunda célula expresa un polipéptido del MHC quimérico humano/no humano que se asocia al correceptor de linfocitos T quimérico humano/no humano. La primera célula puede ser un linfocito T no humano. En otras realizaciones, la segunda célula es una célula presentadora de antígeno no humana.

### Breve descripción de los dibujos

La **FIG. 1** es una representación esquemática (no a escala) de un complejo receptor de linfocitos T humanizado que comprende proteínas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR humanizado, MHC de Clase I humanizado que forma complejo con  $\beta 2$  microglobulina humanizada y heterodímero de CD8 humanizado (panel izquierdo); así como un complejo receptor de linfocitos T que comprende proteínas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR humanizado, heterodímero de MHC de Clase II humanizado y CD4 humanizado (panel derecho). El antígeno presentado por el MHC humanizado se representa como un círculo. Las regiones del ratón se representan como formas rellenas, mientras que las regiones humanas se representan como formas rayadas.

Las **FIG. 2A-C** proporcionan una representación esquemática (no a escala) de loci de MHC I y MHC II quiméricos de ejemplo, por ejemplo, locus de HLA-A2/H-2K quimérico (**FIG. 2a**), locus de HLA-DR2/H-2E quimérico (**FIG. 2b**) y locus  $\beta 2M$  humanizado (**FIG. 2c**). A menos que se indique otra cosa, las secuencias humanas se representan como formas vacías y las secuencias de ratones se representan como formas rellenas. La forma rayada representa el exón 1 de H-2E derivado de una cepa de ratón diferente del locus endógeno (véase el Ejemplo 1.3 y **FIG. 3b**). El casete o casetes de neomicina fosfotransferasa con flox se representan con flechas etiquetadas en consecuencia.

Las **FIG. 3A-C** ilustran una estrategia para generar un locus de CMH humanizado que comprende genes de CMH I y CMH II humanizados. En la realización particular representada en la **FIG. 3A**, el locus de MHC del ratón generado comprende secuencias de HLA-A2/H-2K y HLA-DR2/H-2E quiméricas (H2-K<sup>+/1666</sup> MHC-II<sup>+/6112</sup>) y carece de secuencia H2-D (H2-D<sup>+/supresión</sup>) y secuencia H-2A (el esquema de ingeniería genética también da como resultado una supresión de H-2A, véase el Ejemplo 1.2). Los vectores directores grandes (LTVEC, por sus siglas en inglés) o construcción de Cre recombinasa introducidos en células ES en cada fase de la humanización se ilustran a la derecha de las flechas. Los números MAID o de 4 dígitos se refieren al número de identificación del alelo modificado. La **FIG. 3B** es un diagrama esquemático (no a escala) de un vector de direccionamiento grande de HLA-DR2/H-2E de ejemplo. A menos que se indique otra cosa, las secuencias humanas se representan como formas vacías y las secuencias de ratones se representan como formas rellenas. La forma rayada representa el exón 1 de H-2E derivado de una cepa de ratón diferente del locus endógeno (véase el Ejemplo 1.3). Un casete de higromicina con flox se representa como una flecha etiquetada en consecuencia. La **FIG. 3C** es una representación esquemática (no a escala) de genotipos de ejemplo de loci quiméricos de MHC humano/de ratón (\*\* representa el gen de H-2L que no está presente en todas las cepas de ratón, por ejemplo, no está presente en las cepas de ratón C57BU6 o 129), donde los loci de H-2K y H-2E de ratón endógenos se reemplazan respectivamente por loci de HLA-A2/H-2K y HLA-DR2/H-2E quiméricos humanos/de ratón (formas rayadas), se suprimieron los loci H-2A y H-2D (formas vacías delineadas con líneas discontinuas) y los loci restantes son genes de ratón endógenos (formas sólidas delineadas con líneas continuas).

La **Fig. 4A** representa (no a escala) una estrategia progresiva para la humanización del locus del TCR $\alpha$  de ratón, en donde se añaden secuencialmente segmentos de los genes de la región variable del TCR $\alpha$  en la dirección 5' de una humanización inicial de un locus de ratón suprimido (MAID1540). La secuencia de ratón se indica mediante formas rellenas; la secuencia humana se indica mediante formas vacías. MAID se refiere a un número de ID de alelo modificado. TRAV = segmento V $\alpha$  del TCR, TRAJ = segmento J $\alpha$  del TCR (hTRAJ = TRAJ humano), TRAC = dominio de C $\alpha$  del TCR, TCRD = TCR $\delta$ . La **Fig. 4B** representa (no a escala) una estrategia progresiva para la humanización del locus del TCR $\beta$  de ratón, en donde los segmentos de los genes de la región variable del TCR $\beta$  se añaden secuencialmente al locus variable del TCR $\beta$  de ratón suprimido. La secuencia de ratón se indica mediante formas rellenas; la secuencia humana se indica mediante formas vacías. MAID se refiere a un número de ID de alelo modificado. TRBV o TCRBV = segmento V del TCR $\beta$ .

La **FIG. 5A** representa una representación esquemática (no a escala) del locus de CD4 quimérico. Los exones codificantes humanos se presentan mediante formas rayadas, los exones codificantes de ratón se presentan mediante formas rellenas y los exones no codificantes se presentan mediante formas vacías. Se indican los dominios similares a inmunoglobulina (Ig), transmembrana (TM), exones codificantes citoplasmáticos (CYT) y péptido señal (señal), así como regiones 3' no traducidas (UTR). Un casete de neomicina fosfotransferasa (Pgk-neo) con flox (loxP) se representa con flechas etiquetadas en consecuencia. La **FIG. 5B** representa una representación esquemática (no a escala) de los loci de CD8a y CD8b quiméricos. Los exones codificantes

humanos se presentan mediante formas rayadas, los exones codificantes de ratón se presentan mediante formas rellenas y los exones no codificantes se presentan mediante formas vacías. Se indican los dominios similares a inmunoglobulina (IgV), transmembrana (TM), exones codificantes citoplasmáticos (CYT) y péptido señal (señal), así como regiones 3' no traducidas (UTR). Se representan casetes de higromicina (Hyg) y neomicina fosfotransferasa (Pgk-neo) con flox (loxP) con flechas etiquetadas en consecuencia.

Las **FIG. 6A-C** son gráficos de contorno de FACS de células tímicas aisladas de un ratón de control o de un ratón que comprende loci de MHC I, MHC II  $\alpha$  y  $\beta$ , TCR $\alpha$  y  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  y  $\beta$ , y  $\beta$ 2M (TM I/II B C4/8), humanizados, seleccionados en singuletes y teñidos con (**FIG. 6A**) anticuerpos anti-CD19 de ratón y anti-CD3 de ratón, (**FIG. 6B**) anticuerpos anti-CD19 de ratón y anti-F4/80 de ratón, o (**FIG. 6C**) anticuerpos anti-CD8 $\alpha$  de ratón y anti-CD4 de ratón (panel izquierdo) o anticuerpos anti-CD8 $\alpha$  humano y anti-CD4 humano (panel derecho).

Las **FIG. 7A-G** son gráficos de contorno de FACS de células tímicas aisladas de un ratón de control o de un ratón que comprende loci de MHC I, MHC II  $\alpha$  y  $\beta$ , TCR $\alpha$  y  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  y  $\beta$ , y  $\beta$ 2M (TM I/II B C4/8), humanizados, seleccionados en células CD19+, células F4/80+ o células CD3+ y teñidos con (**FIG. 7A, 7B**) anticuerpos anti-B2M humano o anti-H-2D de ratón; (**FIG. 7C, 7D**) anticuerpos anti-HLA-A2 o anti-HLA-DR; (**FIG. 7E, 7F**) anticuerpos anti-H-2D y anti-I<sup>A</sup>E; o (**FIG. 7G**) anticuerpos anti-CD4 de ratón y anti-CD4 humano (arriba), anticuerpos anti-CD8 $\alpha$  de ratón y anti-CD8 $\alpha$  humano (centro), y anticuerpos anti-CD8 $\beta$  de ratón y anti-CD80 humano (abajo).

La **FIG. 8** proporciona gráficos de contorno de FACS de células tímicas aisladas de un ratón de control o de un ratón que comprende loci de MHC I, MHC II  $\alpha$  y  $\beta$ , TCR $\alpha$  y  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  y  $\beta$ , y  $\beta$ 2M (TM I/II B C4/8), seleccionados en células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> y se tiñeron con anticuerpos anti-FoxP3 de ratón y anti-CD25 de ratón.

Las **FIG. 9A-E** son gráficos de contorno de FACS de células esplénicas aisladas de un ratón de control o de un ratón que comprende loci de MHC I, MHC II  $\alpha$  y  $\beta$ , TCR $\alpha$  y  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  y  $\beta$ , y  $\beta$ 2M (TM I/II B C4/8), humanizados, seleccionados en singuletes, células CD3+, linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+, y teñidos con (**FIG. 9A**) anti-CD19 de ratón y anti-CD3 de ratón, (**FIG. 9B**) anticuerpos anti-CD19 de ratón y anti-F4/80 de ratón, (**FIG. 9C**) anticuerpos anti-CD4 de ratón y anti-CD8 $\alpha$  de ratón (izquierda) o anticuerpos anti-CD4 humano y anti-CD8 $\alpha$  humano (derecha), o anticuerpos (**FIG. 9D, 9E**) anti-CD44 de ratón y anti-CD62L de ratón.

Las **FIG. 10A-G** son gráficos de contorno de FACS de células esplénicas aisladas de un ratón de control o de un ratón que comprende loci de MHC I, MHC II  $\alpha$  y  $\beta$ , TCR $\alpha$  y  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  y  $\beta$ , y  $\beta$ 2M (TM I/II B C4/8), humanizados, seleccionados en células CD19+, células F4/80+ o células CD3+ y teñidos con (**FIG. 10A, 10B**) anticuerpos anti-B2M humano o anti-H-2D de ratón, (**FIG. 10C, 10D**) anticuerpos anti-HLA-A2 o anti-HLA-DR, (**FIG. 10E, 10F**) anticuerpos anti-H-2D y anti-I<sup>A</sup>E o (**FIGURA 10G**) anticuerpos anti-CD4 de ratón y anti-CD4 humano (arriba), anticuerpos anti-CD8 $\alpha$  de ratón y anti-CD8 $\alpha$  humano (centro), y anticuerpos anti-CD8 $\beta$  de ratón y anti-CD8 $\beta$  humano (abajo).

La **FIG. 11** proporciona gráficos de contorno de FACS de células esplénicas aisladas de un ratón de control o de un ratón que comprende loci de MHC I, MHC II  $\alpha$  y  $\beta$ , TCR $\alpha$  y  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  y  $\beta$ , y  $\beta$ 2M (TM I/II B C4/8), seleccionados en células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> y se tiñeron con anticuerpos anti-FoxP3 de ratón y anti-CD25 de ratón.

La **FIG. 12** proporciona el número de células esplénicas (manchas por pocillo (Media + DT); eje y) que producen IFN- $\gamma$  en un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima después del aislamiento de un ratón de control o un ratón que comprende loci de MHC I, MHC II  $\alpha$  y  $\beta$ , TCR $\alpha$  y  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  y  $\beta$ , y  $\beta$ 2M (TM I/II B C4/8) humanizados e incubación en ausencia de péptido (solamente 200.000 células; eje x) o presencia de péptido MAGE-A3 10  $\mu$ g/ml o 1  $\mu$ g/ml (eje x).

La **FIG. 13A** representa la progresión de la infección vírica aguda por la cepa Armstrong en ratones de control o que comprenden loci de MHC I, MHC II  $\alpha$  y  $\beta$ , TCR $\alpha$  y  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  y  $\beta$ , y  $\beta$ 2M (TM I/II B C4/8), humanizados; la línea temporal del experimento se representa en la parte superior de la figura, y la medición de los títulos víricos en diversos días después de la infección para ambas cepas de ratón se representa en el gráfico inferior. La **FIG.**

**13B** representa la progresión de la infección vírica crónica por la cepa de Clon 13 en ratones de control o que comprenden loci de MHC I, MHC II  $\alpha$  y  $\beta$ , TCR $\alpha$  y  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  y  $\beta$ , y  $\beta$ 2M (TM I/II B C4/8), humanizados; la línea temporal del experimento se representa en la parte superior de la figura, y la medición de los títulos víricos el Día 21 después de la infección para ambas cepas de ratón se representa en el gráfico inferior. Se tiñeron linfocitos T de ratones TM I/II B C4/8 o B6 de control no infectados o infectados crónicamente con anticuerpos anti-PD1, anti-Lag3 y anti-Tim3 (**FIG. 13C**; eje x); la figura proporciona una cuantificación de las células que se tiñen de forma positiva (% de células positivas; eje y).

La **FIG. 14** representa la progresión de la infección vírica crónica por la cepa de Clon 13 en ratones de control o TM I/II B C4/8 después de una infección aguda anterior por la cepa Armstrong; la línea temporal del experimento se representa en la parte superior de la figura, y la medición de los títulos víricos el Día 31 después de la infección se representa en el gráfico inferior. Se incluyeron ratones infectados simuladamente en el experimento como control adicional.

Las **FIG. 15A-B** representan el número de células CD8<sup>+</sup> (eje y; células positivas para IFN- $\gamma$ ) que produjeron IFN- $\gamma$  en respuesta a péptidos de LCMV restringidos por HLA-A2 (GPC10-18; N69-77; Z49-58), restringidos por H2D<sup>b</sup> (GP33-41), ovoalbúmina o incubación sola y se aislaron de cualquiera de los animales de control (**FIG. 15A**) o ratones que comprenden loci de MHC I, MHC II  $\alpha$  y  $\beta$ , TCR $\alpha$  y  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  y  $\beta$ , y  $\beta$ 2M (TM I/II B C4/8) humanizados (**FIG. 15B**), cada uno de los cuales recibió una infección simulada (simulación; n = 1 cada grupo) o una infección aguda por cepa de Armstrong (Arm; n = 3 cada grupo). El % de linfocitos IFN $\gamma$ + CD8+ (eje y) después de la estimulación con los péptidos indicados (OVA, GP33, NP69, GPC10, GPC447 o Z49) durante el curso de la infección (días después de la infección; eje x) en ratones que comprendían loci de MHC I, MHC II  $\alpha$  y  $\beta$ , TCR $\alpha$  y  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  y  $\beta$ , y  $\beta$ 2M (TM I/II B C4/8), humanizados, o animales B6 de control se muestran en las **FIG. 15C y 15D**, respectivamente.

**Descripción detallada**

En el presente documento se desvelan roedores (por ejemplo, ratones o ratas) modificados por ingeniería genética para expresar un correceptor de linfocitos T humanizado (por ejemplo, CD4 y/o CD8 humanizado (por ejemplo, CD8 $\alpha$  y/o CD8 $\beta$ )), un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano o humanizado que se une al correceptor de linfocitos T humanizado (por ejemplo, MHC II humano o humanizado (por ejemplo, cadenas  $\alpha$  y/o  $\beta$  de MHC II) y/o MHC I (por ejemplo, MHC I $\alpha$ ), y opcionalmente  $\beta$ 2 microglobulina humana o humanizada) y/o un receptor de linfocitos T (TCR) humano o humanizado, así como embriones, tejidos y células que expresan los mismos. El desarrollo del brazo celular del sistema inmunitario de los animales no humanos desvelados en el presente documento es comparable al de los animales de control, por ejemplo, el timo y el bazo comprenden números absolutos similares de timocitos y células CD3+. Esto contrasta marcadamente con otros animales no humanos modificados para comprender tanto TCR humano ( $\alpha$  y  $\beta$ ) como una molécula del MHC I quimérico humano/de ratón, véase, por ejemplo, Li (2010) Nature Medicine 16:1029-1035 y materiales complementarios. Dichos animales mostraron una disminución en las poblaciones de linfocitos T en comparación no sólo con los animales de control de tipo silvestre, sino también con animales modificados solamente con TCR humano, y animales modificados solamente con la molécula del MHC I quimérico humano/de ratón, véase anteriormente. En consecuencia, en el presente documento se desvelan roedores modificados por ingeniería genética para coexpresar un correceptor de CD4 humanizado y un MHC II humanizado y/o un correceptor de CD8 humanizado y un MHC I humanizado, y un TCR humanizado. También se desvelan métodos para generar un animal modificado genéticamente que exprese al menos un correceptor de linfocitos T humanizado (por ejemplo, CD4 y/o CD8 humanizado), al menos un MHC humanizado que se asocie al correceptor de linfocitos T humanizado (por ejemplo, MHC II y/o MHC I humanizados que se asocian a CD4 y/o CD8 humanizados, respectivamente) y el TCR humanizado. También se desvelan métodos para usar los animales modificados por ingeniería genética que generan una respuesta inmunitaria de linfocitos T sustancialmente humanizados para desarrollar terapias humanas.

**Respuestas inmunitarias de linfocitos T sustancialmente humanizados**

En el presente documento se desvelan roedores que están modificados genéticamente para generar respuestas inmunitarias de linfocitos T sustancialmente humanizados. Los ratones desvelados en el presente documento expresan al menos un correceptor de linfocitos T humano o humanizado, al menos un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) humano o humanizado capaz de asociarse al menos a un correceptor de linfocitos T humano o humanizado, y/o un receptor de linfocitos T (TCR) humano o humanizado, que es preferentemente capaz de reconocer un antígeno presentado en el contexto de MHC humano o humanizado en asociación con un correceptor de linfocitos T humano o humanizado y proporcionar señales de activación a la célula no humana, por ejemplo, linfocito T no humano, que expresa el TCR humano o humanizado. El correceptor de linfocitos T humano o humanizado, el TCR humano o humanizado y/o el MHC humano o humanizado pueden estar codificados por el genoma del animal no humano. En realizaciones preferidas, tras la inmunización con un antígeno, los roedores presentan epítomos restringidos por HLA del antígeno de TCR derivados de segmentos del gen de TCR humano, por ejemplo, un segmento V del TCR $\alpha$  humano, un segmento J del TCR $\alpha$  humano, un segmento V del TCR $\beta$  humano, un segmento D del TCR $\beta$  humano y/o un segmento J del TCR $\beta$  humano.

En consecuencia, en el presente documento se desvela un animal roedor modificado genéticamente cuyo genoma comprende (por ejemplo, en un locus endógeno) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del correceptor de linfocitos T humanizado (por ejemplo, polipéptido de CD4 o CD8), en donde el polipéptido del correceptor de linfocitos T quimérico comprende sustituciones conservadoras de aminoácidos de la secuencia o secuencias de aminoácidos desveladas en el presente documento y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC humanizado que se asocia al polipéptido del correceptor de linfocitos T humanizado, en donde el polipéptido del MHC humanizado comprende sustituciones de aminoácidos conservadoras de las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento.

Una sustitución de aminoácido conservadora incluye la sustitución de un resto de aminoácido por otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral, grupo R, con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobia). Se pueden conseguir sustituciones conservadoras de aminoácidos modificando una secuencia de nucleótidos con el fin de introducir un cambio de nucleótidos que codificará la sustitución conservadora. En general, una sustitución conservadora de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de interés de una proteína, por ejemplo, la capacidad de CD4 o CD8 para asociarse a, por ejemplo, unirse a MHC II o MHC I, respectivamente, y podrá, por ejemplo, aumentar la sensibilidad del TCR al antígeno presentado por el MHC. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen cadenas laterales alifáticas tales como glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; cadenas laterales de hidroxilo alifáticas tales como serina y treonina; cadenas laterales que contienen amida tales como asparagina y glutamina; cadenas laterales aromáticas tales como fenilalanina, tirosina y triptófano; cadenas laterales básicas tales como lisina, arginina e histidina; cadenas laterales ácidas tales como ácido aspártico y ácido glutámico; y, cadenas laterales que contienen azufre tales como cisteína y metionina. Los grupos de sustituciones de aminoácidos conservadoras incluyen, por ejemplo, valina/leucina/isoleucina, fenilalanina/arginina, lisina/arginina, alaninvalina, glutamato/aspartato, y asparagina/glutamina. En algunas realizaciones, una sustitución de aminoácidos conservadora puede ser una

sustitución de cualquier resto natural en una proteína con alanina, como se usa en, por ejemplo, la mutagénesis por barrido de alanina. En algunas realizaciones, se realiza una sustitución conservadora que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica de PAM250 desvelada en Gonnet *et al.* ((1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256:1443-45). En algunas realizaciones, la sustitución es una sustitución moderadamente conservadora en donde la sustitución tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica de PAM250.

Un experto en la materia entenderá que en la adición a los restos de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos del correceptor de linfocitos T humanizados, polipéptidos del MHC humanizados y/o regiones variables del TCR descritas en el presente documento, debido a la degeneración del código genético, otros ácidos nucleicos pueden codificar los polipéptidos descritos en el presente documento. Por lo tanto, además de un animal no humano modificado genéticamente que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del correceptor de linfocitos T humanizado (por ejemplo, polipéptido de CD4 o CD8), un locus génico variable del receptor de linfocitos T sin reordenar (por ejemplo, TCR $\alpha$  y/ o TCR $\beta$ ) que comprende segmentos génicos sin reordenar humanos y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC humanizado capaz de asociarse al polipéptido del correceptor de linfocitos T humanizado con sustituciones de aminoácidos conservadoras, también se desvela un animal no humano cuyo genoma comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del correceptor de linfocitos T humanizado (por ejemplo, polipéptido de CD4 o CD8), un locus génico variable del receptor de linfocitos T sin reordenar (por ejemplo, TCR $\alpha$  y/ o TCR $\beta$ ) que comprende segmentos génicos sin reordenar humanos y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC humanizado capaz de asociarse al polipéptido del correceptor de linfocitos T humanizado, que difiere del descrito en el presente documento debido a la degeneración del código genético.

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

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

La expresión "unido operativamente" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos de esta manera están en una relación que les permite funcionar en su manera prevista. De esta manera, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína puede estar unida operativamente a secuencias reguladoras (por ejemplo, un promotor, potenciador, secuencia silenciadora, etc.) con el fin de conservar la regulación de la transcripción adecuada. Además, diversas porciones de la proteína quimérica o humanizada de la divulgación pueden unirse operativamente para retener el adecuado plegado, procesamiento, direccionamiento, expresión y otras propiedades funcionales de la proteína en la célula. A menos que se indique lo contrario, diversos dominios de la proteína quimérica o humanizada se unen operativamente entre sí.

El término "reemplazo", en referencia al reemplazo de genes se refiere a colocar material genético exógeno en un locus genético endógeno, reemplazando de este modo la totalidad o una porción del gen endógeno con una secuencia del ácido nucleico ortóloga u homóloga. Como se demuestra en los Ejemplos a continuación, en una realización, las secuencias de ácido nucleico de loci endógenos que codifican porciones de polipéptidos de CD4 o CD8 (CD8 $\alpha$  y/o CD8 $\beta$ ) de ratón se reemplazaron por secuencias de nucleótidos que codifican porciones de polipéptidos de CD4 o CD8 (CD8 $\alpha$  y/o CD8 $\beta$ ) humanos, respectivamente.

"Funcional", como se usa en el presente documento, por ejemplo, en referencia a un polipéptido funcional, se refiere a un polipéptido que conserva al menos una actividad biológica normalmente asociada a la proteína nativa. Por ejemplo, un reemplazo en un locus endógeno (por ejemplo, la sustitución en un locus de CD4 o CD8 no humano endógeno) da como resultado un locus que fracasa en expresar un polipéptido endógeno funcional.

**Correceptor o correceptores de linfocitos T humanizados**

En el presente documento se desvelan animales no humanos que expresan al menos un correceptor de linfocitos T humano o humanizado, por ejemplo, CD4, CD8 $\alpha$  y/o CD8 $\beta$ . En consecuencia, un animal no humano como se desvela en el presente documento comprende al menos uno de una primera, segunda y/o tercera secuencia de nucleótidos, cada una de las cuales codifica un polipéptido del correceptor de linfocitos T humano o quimérico humano/no humano diferente seleccionado de un polipéptido de CD4 humano o humanizado, un polipéptido de CD8 $\alpha$  humano o humanizado, y un polipéptido de CD8 $\beta$  humano o humanizado. El uso de las designaciones primera, segunda, tercera en el presente documento no deben interpretarse como limitantes de los animales no humanos desvelados en el presente documento que requieren las tres secuencias de nucleótidos o la presencia de cualquiera de las secuencias de nucleótidos del correceptor en cualquier orden. En consecuencia, un animal no humano como se desvela en el presente documento puede comprender una secuencia de ácido nucleico o secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido de CD4 humano o humanizado y/o un polipéptido de CD8 humano o humanizado (por ejemplo, CD8 $\alpha$  y/o CD8 $\beta$  humano o humanizado).

Un animal no humano como se desvela en el presente documento comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD4 humano o humanizado. Un animal no humano como se desvela en el presente documento comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8 $\alpha$  humano o humanizado y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8 $\beta$  humano o humanizado. Un animal no humano como se desvela en el presente documento comprende las secuencias de nucleótidos primera y segunda que codifican los polipéptidos de CD8 $\alpha$  y CD8 $\beta$  humanos o humanizados y comprende además una tercera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD4 humano o humanizado.

**CD4 humano o humanizado**

En el presente documento se desvelan ratones modificados por ingeniería genética que comprenden en su genoma, por ejemplo, en un locus de CD4 endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD4 humano o humanizado; por lo tanto, los animales expresan un polipéptido de CD4 humano o humanizado.

El gen de CD4 humano está ubicado en el cromosoma 12 y se cree que contiene 10 exones. El gen de CD4 codifica una proteína con una secuencia señal hidrófoba amino-terminal, codificada por los exones 2 y 3 del gen. La proteína comprende cuatro dominios extracelulares similares a inmunoglobulinas, Ig1-Ig4, también denominados común y respectivamente dominios D1-D4. Maddon *et al.* (1987) Structure and expression of the human and mouse T4 genes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:9155-59. Se cree que el dominio D1 está codificado por el exón 3 (secuencia en dirección 3' del péptido señal) y el exón 4, si bien D2, D3 y D4 están codificados por un exón separado cada uno: exones 5, 6 y 7, respectivamente (véase la **FIG. 5A**: Los dominios D1, D2, D3 y D4 están codificados por secuencias designadas como Ig1, Ig2, Ig3 y Ig4, respectivamente). Littman (1987) The Structure of the CD4 and CD8 Genes, Ann. Rev. Immunol. 5:561-84; Hanna *et al.* (1994) Specific Expression of the Human CD4 Gene in Mature CD4+CD8- and Immature CD4+CD8+ T cells and in Macrophages of Transgenic Mice, Mol. Cell. Biol. 14(2):1084-94; Maddon *et al.*, citado anteriormente. En áreas de alta concentración de proteínas, tales como el área de contacto entre los linfocitos T y las células presentadoras de antígenos, la molécula tiende a homodimerizarse a través de interacciones entre dominios D4 opuestos. Zamoyska (1998) CD4 and CD8: modulators of T cell receptor recognition of antigen and of immune responses? Curr. Opin. Immunol. 10:82-87; Wu *et al.* (1997) Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4, Nature 387:527; Moldovan *et al.* (2002) CD4 Dimers Constitute the Functional Component Required for T Cell Activation, J. Immunol. 169:6261-68.

El dominio D1 de CD4 se parece al dominio variable (V) de inmunoglobulina y, junto con una porción del dominio D2, se cree que se une (se asocia) al MHC II, por ejemplo, en un sitio de unión del correceptor del MHC II. Huang *et al.* (1997) Analysis of the contact sites on the CD4 Molecule with Class II MHC Molecule, J. Immunol. 158:216-25. A su vez, el MHC II interactúa con el correceptor de linfocitos T CD4 en la grieta hidrófoba en el punto de unión entre los dominios  $\alpha 2$  y  $\beta 2$  del MHC II. Wang and Reinherz (2002) Structural Basis of T Cell Recognition of Peptides Bound to MHC Molecules, Molecular Immunology, 38:1039-49.

Se cree que los dominios D3 y D4 del correceptor de CD4 interactúan con el complejo TCR-CD3 ya que la sustitución de estos dos dominios anula la capacidad de CD4 de unirse al TCR. Vignali *et al.* (1996) The Two Membrane Proximal Domains of CD4 Interact with the T Cell Receptor, J. Exp. Med. 183:2097-2107. La molécula CD4 existe como un dímero y se cree que los restos en el dominio D4 de la molécula son responsables de la dimerización de CD4. Moldovan *et al.* (2002) CD4 Dimers Constitute the Functional Components Required for T Cell Activation, J. Immunol. 169:6261-68.

El exón 8 del gen de CD4 codifica el dominio transmembrana, mientras que el resto del gen codifica el dominio citoplasmático. El dominio citoplasmático de CD4 posee muchas funciones distintas. Por ejemplo, el dominio citoplasmático de CD4 recluta una tirosina cinasa Lck. Lck es una cinasa de la familia Src que se asocia a los dominios citoplasmáticos de CD4 y CD8 y la unión simultánea de los correceptores y los TCR al mismo MHC conduce a una mayor fosforilación de tirosina de CD3 y la cadena  $\zeta$  del complejo del TCR, lo que a su vez conduce al reclutamiento de otros factores que desempeñan una función en la activación de los linfocitos T. Itano y sus colaboradores han

propuesto que la cola citoplasmática de CD4 también promueve la diferenciación de los linfocitos T CD4+CD8+ en el linaje CD4+ mediante el diseño y ensayo de la expresión de una proteína híbrida que comprende el dominio extracelular de CD8 y la cola citoplasmática de CD4 en ratones transgénicos. Itano *et al.* (1996) The Cytoplasmic Domain of CD4 Promotes the Development of CD4 Lineage T Cells, *J. Exp. Med.* 183:731-41. La expresión de la proteína híbrida condujo al desarrollo de linfocitos T del linaje CD4, específicos de MHC I. Véase anteriormente.

El correceptor de CD4 parece ser el principal receptor del virus VIH, siendo el agotamiento de los linfocitos T CD4+ un indicador de la progresión de la enfermedad. La cola citoplasmática de CD4 parece ser esencial para suministrar señales apoptóticas a los linfocitos T CD4+ en la apoptosis inducida por VIH. Específicamente, se demostró que la interacción de CD4 y Lck potencia la apoptosis inducida por el VIH en estas células. Corbeil *et al.* (1996) HIV-induced Apoptosis Requires the CD4 Receptor Cytoplasmic Tail and Is Accelerated by Interaction of CD4 with p56lck, *J. Exp. Med.* 183:39-48.

Los linfocitos T se desarrollan en el timo y progresan desde timocitos CD4-/CD8- (doble negativos o DN) inmaduros a timocitos CD4+/CD8+ (doble positivos o DP), que en última instancia se someten a una selección positiva para convertirse en linfocitos T CD4+ o CD8+ (positivos únicos o SP, por sus siglas en inglés). Los timocitos DP que reciben señales a través del TCR restringido por MHC I se diferencian en linfocitos T CD8+, mientras que los timocitos DP que reciben señales a través del TCR restringido por MHC II se diferencian en linfocitos T CD4+. Las señales recibidas por la célula DP que conducen a su diferenciación en linfocitos T CD4+ o CD8+ han sido objeto de mucha investigación. Se han propuesto diversos modelos para la elección del linaje CD4/CD8 y se revisan en Singer. *et al.* (2008) Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8- lineage choice, *Nat. Rev. Immunol.* 8:788-801.

La desactivación de un correceptor de linfocitos T específico como resultado de una selección positiva es producto de la regulación de la transcripción. Para CD4, se ha demostrado que un potenciador ubicado 13 kb en dirección 5' del exón 1 de CD4 regula positivamente la expresión de CD4 en linfocitos T CD4+ y CD8+. Killeen *et al.* (1993) Regulated expression of human CD4 rescues helper T cell development in mice lacking expression of endogenous CD4, *EMBO J.* 12:1547-53. Un silenciador de la transcripción de acción cis ubicado dentro del primer intrón del gen de CD4 murino actúa para silenciar la expresión de CD4 en células distintas de los linfocitos T CD4+. Siu *et al.* (1994) A transcriptional silencer control the developmental expression of the CD4 gene, *EMBO J.* 13:3570-3579,

Debido a que importantes reguladores de la transcripción (por ejemplo, promotores, potenciadores, silenciadores, etc.) que controlan la elección del linaje CD4 faltaban en varias cepas de ratones transgénicos anteriormente desarrollados que expresaban CD4 humano, estos ratones no fueron capaces de recapitular el desarrollo normal del linaje de linfocitos T y produjeron células inmunitarias distintas de los linfocitos T CD4+ que expresaban CD4. Véase, por ejemplo, Law *et al.* (1994) Human CD4 Restores Normal T Cell Development and Function in Mice Deficient in CD4, *J. Exp. Med.* 179:1233-42 (expresión de CD4 en linfocitos T CD8+ y linfocitos B); Fugger *et al.* (1994) Expression of HLA-DR4 and human CD4 transgenes in mice determines the variable region  $\beta$ -chain T-cell repertoire and mediates an HLA-D-restricted immune response, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:6151-55 (CD4 expresado en todos los timocitos CD3+ y linfocitos B). Por lo tanto, puede resultar beneficioso desarrollar un animal modificado genéticamente que conserve el promotor endógeno del ratón y otros elementos reguladores para que el animal produzca linfocitos T que sean capaces de experimentar el desarrollo de linfocitos T y elegir linaje.

Por lo tanto, en diversas realizaciones, la divulgación proporciona un roedor modificado genéticamente que comprende, por ejemplo, en su locus del correceptor de linfocitos T endógeno (por ejemplo, locus de CD4), una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del correceptor de linfocitos T quimérico humano/de roedor. En una realización, una porción humana del polipéptido quimérico comprende toda o sustancialmente toda una porción extracelular (o parte de la misma, por ejemplo, uno o más dominios extracelulares, por ejemplo, al menos dos dominios extracelulares consecutivos) de un correceptor de linfocitos T humano. En una realización, una porción de roedor del polipéptido quimérico comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos de un correceptor de linfocitos T de roedor. En una realización, el roedor expresa un polipéptido del correceptor de linfocitos T quimérico funcional. Por lo tanto, en un aspecto, la divulgación proporciona un roedor modificado genéticamente que comprende en su locus de CD4 endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD4 quimérico humano/de roedor, en donde una porción humana del polipéptido quimérico comprende toda o sustancialmente toda una porción extracelular de un CD4 humano, en donde una porción no humana comprende al menos dominios transmembrana y citoplasmáticos de un CD4 no humano, y en donde el animal expresa un polipéptido de CD4 quimérico funcional. En un aspecto, el roedor sólo expresa el polipéptido de CD4 humanizado, es decir, polipéptido de CD4 quimérico humano/de roedor, y no expresa una proteína CD4 endógena funcional de roedor a partir de su locus de CD4 endógeno.

En una realización, la porción humana del polipéptido de CD4 quimérico humano/de roedor comprende toda o sustancialmente toda la porción extracelular de un polipéptido de CD4 humano. En otra realización, la porción humana del polipéptido de CD4 quimérico humano/de roedor comprende al menos todo o sustancialmente todo el dominio de unión a MHC II del polipéptido de CD4 humano (por ejemplo, una porción sustancial de los dominios D1 y D2 humanos); en una realización, la porción humana del polipéptido de CD4 quimérico humano/de roedor comprende todo o sustancialmente todo de los dominios D1, D2 y D3 del polipéptido de CD4 humano; en otra realización más, la



porción humana del polipéptido de CD4 quimérico humano/de roedor comprende todos o sustancialmente de todos los dominios similares a inmunoglobulina de CD4, por ejemplo, los dominios denominados D1, D2, D3 y D4. En otra realización más, la porción humana del polipéptido de CD4 quimérico humano/de roedor comprende en su porción humana toda o sustancialmente toda la secuencia de CD4 humana que es responsable de interactuar con el MHC II y/o la porción extracelular de un receptor de linfocitos T. En otra realización más, la porción humana del polipéptido de CD4 quimérico humano/de roedor comprende toda o sustancialmente toda la porción extracelular del CD4 humano que es responsable de interactuar con el MHC II y/o el dominio variable de un receptor de linfocitos T. Por lo tanto, en una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la porción humana del polipéptido de CD4 quimérico comprende toda o sustancialmente toda la secuencia codificante de los dominios D1-D2 del CD4 humano (por ejemplo, una porción del exón 3 y los exones 4-5 del gen de CD4 humano); en otra realización, comprende toda o sustancialmente toda la secuencia codificante de D1-D3 del CD4 humano (por ejemplo, una porción del exón 3 y los exones 4-6 del CD4 humano). Por lo tanto, en una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el CD4 quimérico humano/no humano comprende secuencias de nucleótidos que codifican todos o sustancialmente de todos los dominios D1-D3 del CD4 humano. En otra realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la porción humana del polipéptido de CD4 quimérico comprende la secuencia codificante de los dominios D1-D4 del gen de CD4 humano. En otra realización, la secuencia de nucleótidos puede comprender la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal de CD4 de ratón, por ejemplo, la región codificada por porciones de los exones 2-3 del gen de ratón. En otra realización, la secuencia de nucleótidos puede comprender la secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal de CD4 humano. En una realización, el polipéptido de CD4 quimérico humano/no humano comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 78, y la porción humana del polipéptido quimérico abarca aproximadamente los aminoácidos 27-319 de la SEQ ID NO: 78 (expuesta por separado en la SEQ ID NO: 79).

El roedor expresa una secuencia polipeptídica de CD4 quimérico humano/de roedor. Una porción humana de la secuencia de CD4 quimérico puede comprender una o más modificaciones conservadoras o no conservadoras.

En una realización, se proporciona un animal no humano que expresa una secuencia de CD4 humano, en donde la secuencia de CD4 humano es al menos aproximadamente el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a la secuencia de CD4 humano. En una realización específica, la secuencia de CD4 humano es al menos aproximadamente el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a la secuencia de CD4 humano descrita en los Ejemplos. En una realización, la secuencia de CD4 humano comprende una o más sustituciones conservadoras. En una realización, la secuencia de CD4 humano comprende una o más sustituciones no conservadoras.

En algunas realizaciones, una porción, por ejemplo, una porción humana del CD4 quimérico, puede comprender sustancialmente toda la secuencia indicada en el presente documento (por ejemplo, sustancialmente todo un dominio de proteína indicado en el presente documento). Sustancialmente todas las secuencias generalmente incluyen el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de los aminoácidos que se cree que representan una porción particular de la proteína (por ejemplo, un dominio funcional particular, etc.). Un experto en la materia entendería que los límites de un dominio funcional pueden variar ligeramente dependiendo de los métodos de alineación y predicción de dominio utilizados.

La porción de roedor del polipéptido de CD4 quimérico humano/de roedor comprende al menos dominios transmembrana y citoplasmáticos del polipéptido de CD4 de roedor. Debido a las importantes funciones que desempeña el dominio citoplasmático de CD4, la retención de la secuencia endógena de roedores (por ejemplo, ratón) en animales modificados genéticamente garantiza la conservación de la señalización intracelular adecuada y otras funciones del correceptor. En una realización, el animal no humano es un ratón, y el polipéptido de CD4 no humano es un polipéptido de CD4 de ratón. Aunque en los Ejemplos se describe una secuencia de CD4 de ratón específica, cualquier secuencia adecuada derivada de la misma, por ejemplo, una secuencia que comprende sustituciones de aminoácidos conservadoras/no conservadoras, está comprendida en el presente documento. En una realización, la porción no humana del correceptor de CD4 quimérico comprende cualquier secuencia del CD4 endógeno que no se ha humanizado.

El roedor descrito en el presente documento puede comprender en su locus endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD4 quimérico humano/de roedor. En una realización, esto da como resultado un reemplazo de una porción de un gen de CD4 endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica una porción de un polipéptido de CD4 humano. En una realización, dicho reemplazo es un reemplazo de la secuencia de nucleótidos endógena que codifica, por ejemplo, todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de un CD4 de roedor, por ejemplo, una secuencia que codifica al menos todo o sustancialmente todo del primer dominio similar a inmunoglobulina (es decir, D1) de un CD4 de roedor (por ejemplo, una secuencia que codifica todo o sustancialmente todo de los dominios D1-D2 de un CD4 de roedor, por ejemplo, una secuencia que codifica todo o sustancialmente todo de los dominios D1-D3 de un CD4 de roedor, por ejemplo, una secuencia que codifica todo o sustancialmente todo de los dominios D1-D4 de un CD4 de roedor), con una secuencia de nucleótidos humana que codifica los mismos. En una realización, el reemplazo da como resultado una proteína quimérica que comprende la secuencia de CD4 humana que es responsable de interactuar con el MHC II y/o la porción extracelular de un receptor de linfocitos T. En otra realización más, el reemplazo da como resultado una proteína quimérica que comprende la secuencia de CD4 humana que es responsable de interactuar con el MHC II y/o el dominio variable de un receptor de linfocitos T. En una

realización, el reemplazo no comprende un reemplazo de una secuencia de CD4 que codifica al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido de CD4 de un roedor. Por lo tanto, en una realización, el roedor expresa un polipéptido de CD4 quimérico humano/de roedor a partir del locus de CD4 de roedor endógeno. En otra realización más, el reemplazo da como resultado una proteína que comprende una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO:78.

En una realización, se proporciona la secuencia de nucleótidos del locus de CD4 quimérico humano/de roedor, por ejemplo, el locus de CD4 quimérico humano/de ratón descrito en el presente documento. En una realización, debido a que la secuencia de CD4 quimérico humano/no humano (por ejemplo, humano/de roedor, por ejemplo, humano/de ratón) se coloca en el locus de CD4 endógeno no humano (por ejemplo, de roedor, por ejemplo, de ratón), retiene el elemento potenciador de CD4 ubicado en dirección 5' del primer exón de CD4. En una realización, el reemplazo en el locus de CD4 endógeno de roedor, por ejemplo, de ratón, comprende un reemplazo de, por ejemplo, una porción del exón 3 que codifica D1 y los exones 4-6 que codifican el resto de D1 y D2-D3 del polipéptido de CD4; por lo tanto, en una realización, el locus de CD4 quimérico retiene el silenciador de acción cis ubicado en el intrón 1 del gen de CD4 no humano (por ejemplo, de ratón). Por lo tanto, en una realización, el locus quimérico retiene promotor y elementos reguladores de CD4 no humanos (por ejemplo, de roedor, por ejemplo, de ratón) endógenos. En otra realización, el locus quimérico puede contener elementos promotores y reguladores humanos en la medida en que permitan la expresión adecuada de CD4, el desarrollo de linfocitos T CD4+, la elección del linaje CD4 y la función de correceptor. Por lo tanto, los animales desvelados en el presente documento pueden comprender una modificación genética que no altera la elección del linaje y el desarrollo adecuados de los linfocitos T. En una realización, los roedores, por ejemplo, los ratones de la invención no expresan polipéptido de CD4 quimérico en células inmunitarias distintas de las células que normalmente expresan CD4. En una realización, los animales no expresan CD4 en linfocitos B ni en linfocitos T CD8+ maduros. En una realización, el reemplazo da como resultado la retención de elementos que permiten una regulación espacial y temporal adecuada de la expresión de CD4.

En diversas realizaciones, un roedor (por ejemplo, un ratón o una rata) que expresa una proteína CD4 quimérica funcional a partir de un locus de CD4 quimérico como se describe en el presente documento presenta la proteína quimérica en una superficie celular, por ejemplo, la superficie de linfocitos T. En una realización, el animal no humano expresa la proteína CD4 quimérica en una superficie celular en una distribución celular que es la misma que la observada en un ser humano. En un aspecto, la proteína CD4 es capaz de interactuar con una proteína MHC II expresada en la superficie de una segunda célula, por ejemplo, una célula presentadora de antígeno (APC, por sus siglas en inglés).

### CD8 humano o humanizado

En diversas realizaciones, la divulgación proporciona generalmente roedores modificados por ingeniería genética que comprenden en su genoma, por ejemplo, en un locus de CD8 endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8 humano o humanizado; por lo tanto, los animales expresan un polipéptido de CD8 humano o humanizado. En diversas realizaciones, la divulgación proporciona roedores que comprenden en su genoma, por ejemplo, en un locus de CD8 endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8α humano o humanizado y/o una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8β humano o humanizado. Por lo tanto, el roedor modificado genéticamente expresa un CD8α humano o humanizado y/o un polipéptido o polipéptidos de CD8β humano o humanizado.

La proteína CD8 humana normalmente se expresa en la superficie celular como heterodímero de dos polipéptidos, CD8α y CD8β, aunque también se han detectado homodímeros y homomultímeros unidos por enlaces disulfuro (por ejemplo, en linfocitos NK y linfocitos T γδ intestinales, que expresan CD8αα). Los genes que codifican CD8α y CD8β humanos se encuentran muy cerca uno del otro en el cromosoma 2. Nakayama *et al.* (1992) Recent Duplication of the Two Human CD8 β-chain genes, *J. Immunol.* 148:1919-27. La proteína CD8α contiene un péptido líder, una región similar a inmunoglobulina V, una región bisagra, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática. Norment *et al.* (1989) Alternatively Spliced mRNA Encodes a Secreted Form of Human CD8α. Characterization of the Human CD8α gene, *J. Immunol.* 142:3312-19. Los exones/intrones del gen de CD8α se representan esquemáticamente en la **FIG. 5B**.

El gen de CD8β humano se encuentra en dirección 5' del gen de CD8α en el cromosoma 2. Se han publicado múltiples isoformas generadas por corte y empalme alternativo del gen de CD8β, y se predice que una isoforma carecerá de un dominio transmembrana y generará una proteína secretada. Norment *et al.* (1988) A second subunit of CD8 is expressed in human T cells, *EMBO J.* 7:3433-39. Los exones/intrones del gen de CD8β también se representan esquemáticamente en la **FIG. 5B**.

La proteína CD8β unida a la membrana contiene una secuencia señal N-terminal, seguida del dominio similar a inmunoglobulina V, una región bisagra extracelular corta, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática. Véase, Littman (1987) The structure of the CD4 and CD8 genes, *Ann Rev. Immunol.* 5:561-84. La región bisagra es un sitio de glucosilación extensa, que se cree que mantiene su conformación y protege la proteína de la escisión por proteasas. Leahy (1995) A structural view of CD4 and CD8, *FASEB J.* 9:17-25.

La proteína CD8 se expresa habitualmente en linfocitos T citotóxicos e interactúa con moléculas del MHC I. La interacción está mediada por la unión de CD8 al dominio  $\alpha_3$  del MHC I. Aunque la unión del MHC de clase I al CD8 es aproximadamente 100 veces más débil que la unión del TCR al MHC de clase I, la unión de CD8 potencia la afinidad de la unión a TCR. Wooldridge *et al.* (2010) MHC Class I Molecules with Superenhanced CD8 Binding Properties Bypass the Requirement for Cognate TCR Recognition and Nonspecifically Activate CTLs, *J. Immunol.* 184:3357-3366.

La unión de CD8 a moléculas del MHC de clase I es específica de especie; el homólogo de ratón de CD8, Lyt-2, demostró unir moléculas de H-2D<sup>d</sup> en el dominio  $\alpha_3$ , pero no unió moléculas de HLA-A. Connolly *et al.* (1988) The Lyt-2 Molecule Recognizes Residues in the Class I  $\alpha_3$  Domain in Allogeneic Cytotoxic T Cell Responses, *J. Exp. Med.* 168:325-341. La unión diferencial se debió supuestamente a determinantes de tipo CDR (de tipo CDR1 y CDR2) sobre CD8 que no se habían conservado entre humanos y ratones. Sanders *et al.* (1991) Mutations in CD8 that Affect Interactions with HLA Class I and Monoclonal Anti-CD8 Antibodies, *J. Exp. Med.* 174:371-379; Vitiello *et al.* (1991) Analysis of the HLA-restricted Influenza-specific Cytotoxic T Lymphocyte Response in Transgenic Mice Carrying a Chimeric Human-Mouse Class I Major Histocompatibility Complex, *J. Exp. Med.* 173:1007-1015; y, Gao *et al.* (1997) Crystal structure of the complex between human CD8 $\alpha\alpha$  and HLA-A2, *Nature* 387:630-634. Se ha indicado que CD8 se une a HLA-A2 en una región conservada en el dominio  $\alpha_3$  (en la posición 223-229). Una única sustitución (V245A) en HLA-A redujo la unión de CD8 a HLA-A, con una reducción grande simultánea en la lisis mediada por linfocitos T. Salter *et al.* (1989), Polymorphism in the  $\alpha_3$  domain of HLA-A molecules affects binding to CD8, *Nature* 338:345-348. En general, el polimorfismo en el dominio  $\alpha_3$  de las moléculas de HLA-A también afectó a la unión a CD8. Véase anteriormente. En ratones, la sustitución de aminoácidos en el resto 227 en H-2D<sup>d</sup> afectó a la unión de Lyt-2 de ratón a H-2D<sup>d</sup>, y las células transfectadas con un H-2D<sup>d</sup> mutante no fueron lisadas por los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Potter *et al.* (1989) Substitution at residue 227 of H-2 class I molecules abrogates recognition by CD8-dependent, but not CD8-independent, cytotoxic T lymphocytes, *Nature* 337:73-75. Por lo tanto, la expresión de CD8 humano o humanizado puede ser beneficiosa para estudiar las respuestas de los linfocitos T al antígeno presentado por el MHC I humano o humanizado.

De manera similar a CD4, el dominio citoplasmático de CD8 interactúa con la tirosina cinasa Lck, lo que a su vez conduce a la activación de los linfocitos T. Aunque Lck parece interactuar con el dominio citoplasmático de CD8 $\alpha$ , parece que esta interacción está regulada por la presencia del dominio citoplasmático de CD8 $\beta$  porque las mutaciones o la supresión del dominio citoplasmático de CD8 $\beta$  dieron como resultado una actividad reducida de Lck asociada a CD8 $\alpha$ . Irie *et al.* (1998) The cytoplasmic domain of CD8 $\beta$  Regulates Lck Kinase Activation and CD8 T cell Development, *J. Immunol.* 161: 183-91. La reducción de la actividad de Lck se asoció a una alteración en el desarrollo de los linfocitos T. Véase anteriormente.

La expresión de CD8 en células adecuadas, por ejemplo, linfocitos T citotóxicos, está estrechamente regulada por una diversidad de elementos potenciadores ubicados en todo el locus de CD8. Por ejemplo, al menos 4 regiones de hipersensibilidad a la ADNasa I, regiones con frecuencia asociadas a la unión del regulador, se han identificado en el locus de CD8. Hosert *et al.* (1997) A CD8 genomic fragment that directs subset-specific expression of CD8 in transgenic mice, *J. Immunol.* 158:4270-81. Desde el descubrimiento de estas regiones hipersensibles a la ADNasa I en el locus de CD8, se han identificado al menos 5 elementos potenciadores, extendidos por todo el locus de CD8, que regulan la expresión de CD8 $\alpha$  y/o  $\beta$  en linfocitos T de diversos linajes, incluyendo linfocitos T SP CD8, DP, o células que expresan  $\gamma\delta$ TCR. Véase, por ejemplo, Kioussis *et al.* (2002) Chromatin and CD4, CD8A, and CD8B gene expression during thymic differentiation, *Nature Rev.* 2:909-919 y Errata en línea; Ellmeier *et al.* (1998) Multiple Development Stage-Specific Enhancers Regulate CD8 Expression in Developing Thymocytes and in Thymus-Independent T cells, *Immunity* 9: 485-96.

Por lo tanto, de manera similar al beneficio derivado de retener el promotor y los elementos reguladores de CD4 endógeno para animales modificados por ingeniería genética con CD4 humano o humanizado, en algunas realizaciones, podría ser beneficioso desarrollar un roedor modificado genéticamente que retenga el promotor endógeno y los elementos reguladores de ratón que controlarían la expresión del CD8 humano o humanizado. Puede haber un beneficio particular en la creación de animales modificados por ingeniería genética que comprendan un reemplazo de secuencias endógenas de roedor que codifican las proteínas CD8 $\alpha$  y/o  $\beta$  por aquellas que codifican las proteínas CD8 $\alpha$  y/o  $\beta$  humanas o humanizadas, como se describe en el presente documento.

En diversas realizaciones, la divulgación proporciona un roedor modificado genéticamente que comprende en su genoma, por ejemplo, en su locus de CD8 endógeno, al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8 quimérico humano/de roedor (por ejemplo, polipéptido de CD8 $\alpha$  y/o  $\beta$ ), en donde una porción humana del polipéptido comprende toda o sustancialmente toda una porción extracelular (o una parte de la misma, por ejemplo, un dominio extracelular) de un polipéptido de CD8 humano (por ejemplo, CD8 $\alpha$  y/o  $\beta$ ), en donde una porción de roedor comprende al menos dominios transmembrana y citoplasmáticos de un CD8 no humano (por ejemplo, CD8 $\alpha$  y/o  $\beta$ ), y en donde el animal expresa el polipéptido de CD8 quimérico (por ejemplo, polipéptido de CD8 $\alpha$  y/o  $\beta$ ). Por lo tanto, en una realización, la divulgación proporciona un roedor modificado genéticamente que comprende en su locus de CD8 de roedor endógeno una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8 $\alpha$  quimérico humano/de roedor y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8 $\beta$  quimérico humano/de roedor, en donde la primera secuencia de nucleótidos comprende una secuencia que codifica toda o sustancialmente toda la porción extracelular de un polipéptido de CD8 $\alpha$  humano y al menos los dominios

transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido de CD8 $\alpha$  de roedor, y en donde la segunda secuencia de nucleótidos comprende una secuencia que codifica toda o sustancialmente toda la porción extracelular de un polipéptido de CD8 $\beta$  humano y al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido de CD $\beta$  de roedor, en donde el animal expresa una proteína CD8 quimérica humana/de roedor funcional. En un aspecto, el roedor sólo expresa un polipéptido de CD8 humanizado (por ejemplo, polipéptido de CD8 $\alpha$  y/o  $\beta$  quimérico humano/de roedor), y no expresa un polipéptido o polipéptidos de CD8 de roedor funcionales correspondientes del locus de CD8 endógeno.

En una realización, el polipéptido de CD8 $\alpha$  quimérico humano/de roedor comprende en su porción humana toda o sustancialmente toda la porción extracelular de un polipéptido de CD8 $\alpha$  humano. En una realización, la porción humana del polipéptido de CD8 $\alpha$  quimérico comprende al menos el dominio de unión a MHC I del polipéptido de CD8 $\alpha$  humano. En una realización, la porción humana del polipéptido de CD8 $\alpha$  quimérico comprende la secuencia de al menos todo o sustancialmente todo el dominio de tipo V de inmunoglobulina del CD8 $\alpha$  humano. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la porción humana del polipéptido de CD8 $\alpha$  quimérico comprende al menos los exones que codifican una porción extracelular del polipéptido de CD8 $\alpha$  humano. En una realización, la secuencia de nucleótidos comprende al menos los exones que codifican los dominios similares a Ig V. En una realización, la porción extracelular de un polipéptido de CD8 $\alpha$  humano es una región que abarca la porción del polipéptido que no es un dominio transmembrana o citoplasmático. La secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de CD8 $\alpha$  quimérico humano/de roedor comprende la secuencia que codifica un péptido señal de CD8 $\alpha$  no humano (por ejemplo, de roedor, por ejemplo, de ratón). Como alternativa, la secuencia de nucleótidos puede comprender la secuencia que codifica una secuencia señal de CD8 $\alpha$  humana. En una realización, el polipéptido de CD8 $\alpha$  quimérico humano/no humano comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 88, y la porción humana del polipéptido quimérico se expone en los aminoácidos 28-179 de la SEQ ID NO: 88 (representada por separado en la SEQ ID NO: 89).

De forma similar, en una realización, el polipéptido de CD8 $\beta$  quimérico humano/de roedor comprende en su porción humana toda o sustancialmente toda la porción extracelular de un polipéptido de CD8 $\beta$  humano. En una realización, la porción humana del polipéptido de CD8 $\beta$  quimérico comprende la secuencia de todo o sustancialmente todo el dominio similar a inmunoglobulina V de CD8 $\beta$  humano. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la porción humana del polipéptido de CD8 $\beta$  quimérico comprende al menos los exones que codifican la porción extracelular del polipéptido de CD8 $\beta$  humano. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la porción humana del polipéptido de CD8 $\beta$  quimérico humano/de roedor comprende al menos los exones que codifican el dominio similar a IgG V del CD8 $\beta$  humano. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de CD8 $\beta$  quimérico humano/no humano comprende la secuencia que codifica un péptido señal de CD8 $\beta$  de roedor (por ejemplo, de ratón). Como alternativa, la secuencia de nucleótidos puede comprender la secuencia que codifica una secuencia señal de CD8 $\beta$  humana. En una realización, el polipéptido de CD8 $\beta$  quimérico humano/de roedor comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 83, y la porción humana del polipéptido quimérico se expone en los aminoácidos 15-165 de la SEQ ID NO: 83 (representada por separado en la SEQ ID NO: 84).

El roedor expresa polipéptidos de CD8 $\alpha$  y CD8 $\beta$  humanos/de roedor quiméricos. En algunas realizaciones, la porción humana del polipéptido de CD8 $\alpha$  y/o  $\beta$  quimérico humano/de roedor comprende una o más modificaciones conservadoras o no conservadoras.

En una realización, se proporciona un roedor que expresa una secuencia del polipéptido de CD8 $\alpha$  y  $\beta$  humano, en donde la secuencia del polipéptido de CD8 $\alpha$  y/o  $\beta$  humano es al menos aproximadamente el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a una secuencia del polipéptido de CD8 $\alpha$  y/o  $\beta$  humano, respectivamente. En una realización específica, la secuencia del polipéptido de CD8 $\alpha$  y/o  $\beta$  humano es al menos aproximadamente el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a la secuencia del polipéptido de CD8 $\alpha$  y/o  $\beta$  humano respectiva descrita en los Ejemplos. En una realización, la secuencia del polipéptido de CD8 $\alpha$  y/o  $\beta$  humano comprende una o más sustituciones conservadoras. En una realización, la secuencia del polipéptido de CD8 $\alpha$  y/o  $\beta$  humano comprende una o más sustituciones no conservadoras.

En algunas realizaciones, una porción, por ejemplo, una porción humana del CD8 quimérico, puede comprender sustancialmente toda la secuencia indicada en el presente documento (por ejemplo, sustancialmente todo un dominio de proteína indicado en el presente documento). Sustancialmente todas las secuencias generalmente incluyen el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de los aminoácidos que se cree que representan una porción particular de la proteína (por ejemplo, un dominio funcional particular, etc.). Un experto en la materia entendería que los límites de un dominio funcional pueden variar ligeramente dependiendo de los métodos de alineación y predicción de dominio utilizados.

La porción de roedor del polipéptido de CD8 $\alpha$  y/o  $\beta$  quimérico humano/de roedor comprende al menos un dominio transmembrana y/o citoplasmático del polipéptido de CD8 $\alpha$  y/o  $\beta$  de roedor, respectivamente. Debido a las importantes funciones que desempeña el dominio citoplasmático de CD8, la retención de la secuencia endógena de roedores (por ejemplo, ratón) en animales modificados genéticamente garantiza la conservación de la señalización intracelular adecuada y otras funciones del correceptor. En una realización, el roedor es un ratón, y el polipéptido de CD8 $\alpha$  y/o  $\beta$

de roedor es un polipéptido de CD8α y/o β de ratón, respectivamente. Aunque se describen secuencias de CD8α y β de ratón específicas en los Ejemplos, cualquier secuencia adecuada derivada de la misma, por ejemplo, una secuencia que comprende sustituciones de aminoácidos conservadoras/no conservadoras, está comprendida en el presente documento. En una realización, el roedor (por ejemplo, ratón) retiene cualquier secuencia endógena que no se haya humanizado.

El animal no humano descrito en el presente documento puede comprender en su locus endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8α y/o β quimérico humano/no humano. En una realización, esto da como resultado un reemplazo de una porción de un gen de CD8α endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica una porción de un polipéptido de CD8α humano, y/o un reemplazo de una porción de un gen de CD8β endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica una porción de un polipéptido de CD8β humano. En una realización, dicho reemplazo es un reemplazo de la secuencia de nucleótidos endógena que codifica toda o sustancialmente toda la porción extracelular de un CD8α y/o β de roedor con un nucleótido humano con una secuencia de nucleótidos humana que codifica el mismo. En una realización, dicho reemplazo es un reemplazo de una secuencia que codifica al menos todo o sustancialmente todo el dominio similar a inmunoglobulina V de un CD8α y/o β de roedor con una secuencia de nucleótidos humana que codifica el mismo. En una realización, el reemplazo no comprende un reemplazo de una secuencia CD8α y/o β que codifica el dominio transmembrana y citoplasmático de un polipéptido de CD8α y/o β de roedor. Por lo tanto, el roedor expresa un polipéptido de CD8α y/o β quimérico humano/de roedor del locus de CD8 de roedor endógeno. En otra realización más, el reemplazo da como resultado una proteína CD8α y/o β que comprende una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 88 y/u 84, respectivamente.

Se desvela la secuencia de nucleótidos del locus de CD8 quimérico humano/no humano (por ejemplo, el locus de CD8 quimérico de roedor, por ejemplo, el locus de CD8 de ratón quimérico). En una realización, debido a que la secuencia de CD8α y/o β quiméricos humanos/de roedor (por ejemplo, humano/de roedor, por ejemplo, humano/de ratón) se coloca en los locus de CD8α y/o β no humanos (por ejemplo, de roedor, por ejemplo, de ratón) endógenos respectivos, retiene elementos promotores y reguladores de CD8α y/o β endógenos. En otra realización, el locus quimérico puede contener elementos promotores y reguladores de CD8α y/o β humanos en la medida en que permitan la expresión adecuada de CD8α y/o β (la expresión proteica espacial y temporal adecuada), el desarrollo de linfocitos T CD8+, la elección del linaje CD8 y la función de correceptor. Por lo tanto, en una realización, los roedores comprenden una modificación genética que no altera la elección del linaje y el desarrollo adecuados de los linfocitos T. En una realización, los roedores (por ejemplo, ratones) no expresan la proteína CD8 quimérica en células inmunitarias distintas de las células que normalmente expresan CD8, por ejemplo, los animales no expresan CD8 en linfocitos B ni en linfocitos T CD4+ maduros. En una realización, el reemplazo da como resultado la retención de elementos que permiten una regulación espacial y temporal adecuada de la expresión de CD8α y/o β.

En diversas realizaciones, un roedor (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o rata) que expresa una proteína CD8 quimérica funcional (por ejemplo, CD8αβ o CD8αα) a partir de un locus de CD8 quimérico como se describe en el presente documento presenta la proteína quimérica en una superficie celular. En una realización, el roedor expresa la proteína DC8 quimérica en una superficie celular en una distribución celular que es la misma que la observada en un ser humano. En una realización, la proteína CD8 es capaz de interactuar con una proteína MHC I expresada en la superficie de una segunda célula.

### ***Receptor de linfocitos T humano o humanizado***

En el presente documento se desvelan animales no humanos modificados por ingeniería genética que comprenden un sistema inmunitario de linfocitos T sustancialmente humanizados. En alguna realización, un roedor como se desvela en el presente documento comprende, por ejemplo, en su genoma, (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un correceptor de linfocitos T quimérico humano/de roedor, en donde la porción humana del polipéptido del correceptor de linfocitos T quimérico está codificada por una secuencia que codifica un dominio extracelular de un correceptor de linfocitos T humano, y en donde la secuencia que codifica el dominio extracelular de un correceptor de linfocitos T humano está unida operativamente a un nucleótido que comprende una secuencia que codifica un dominio transmembrana y/o citoplasmático del correceptor de linfocitos T de roedor; (b) una región génica variable del receptor de linfocitos T (TCR) sin reordenar que comprende al menos un segmento V humano, opcionalmente al menos un segmento D humano y al menos un segmento J humano, en donde los segmentos V, opcionalmente, D y J, sin reordenar, del gen de la región variable del TCR pueden recombinarse para formar un gen reordenado unido operativamente a una secuencia génica constante del TCR de roedor; y (c) una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC quimérico humano/de roedor, en donde una porción humana del polipéptido del MHC quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido del MHC humano que se asocia a la porción humana del polipéptido del correceptor de linfocitos T quimérico. Los roedores también comprenden un polipéptido de la β2 microglobulina humano o humanizado.

En consecuencia, en diversas realizaciones, la invención proporciona generalmente roedores modificados por ingeniería genética en donde los animales no humanos comprenden en el genoma loci de genes variables de TCR humanizados sin reordenar, por ejemplo, una región génica variable del TCR humana sin reordenar que comprende segmentos variables del TCR humano capaces de recombinarse para formar una secuencia del gen variable del TCR reordenado. Locus de TCR o locus del gen del TCR (por ejemplo, locus del TCRα o locus del TCRβ), como se usan

en el presente documento, se refieren al ADN genómico que comprende la región codificante del TCR, incluyendo la región codificante del TCR completa, incluyendo las secuencias de V(D)J sin reordenar, la secuencia potenciadora, la secuencia o secuencias constantes y cualquier secuencia de ADN en dirección 5' o en dirección 3' (UTR, regiones reguladoras, etc.), o intermedia (intrones, etc.). Locus variable de TCR, región variable del TCR o locus génico variable del TCR (por ejemplo, locus génico variable del TCR $\alpha$  o locus génico variable del TCR $\beta$ ), se refieren a ADN genómico que incluye segmentos de la región variable del TCR (región de V(D)J) pero que excluye las secuencias constantes del TCR y, en diversas realizaciones, las secuencias potenciadoras. Pueden incluirse otras secuencias en el locus génico variable del TCR con fines de manipulación genética (por ejemplo, casetes de selección, sitios de restricción, etc.) y estas se incluyen en el presente documento.

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

Los polipéptidos  $\alpha$  y  $\beta$  de los receptores de linfocitos T (y de forma similar, los polipéptidos  $\gamma$  y  $\delta$ ) se unen entre sí a través de un enlace disulfuro. Cada uno de los dos polipéptidos que componen el TCR contiene un dominio extracelular que comprende regiones constantes y variables, un dominio transmembrana, y una cola citoplasmática (el dominio transmembrana y la cola citoplasmática son también una parte de la región constante). La región variable del TCR determina su especificidad antigénica, y de forma similar a las inmunoglobulinas, comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés). De forma similar también a los genes de inmunoglobulinas, los loci de genes variables de los receptores de linfocitos T (por ejemplo, loci de TCR $\alpha$  y TCR $\beta$ ) contienen varios segmentos V(D)J sin reordenar (segmentos (V) variable, (J) de unión, y en TCR $\beta$  y  $\delta$ , de diversidad (D)). Durante el desarrollo de linfocitos T en el timo, el locus génico variable del TCR $\alpha$  experimenta un reordenamiento, de manera que la cadena TCR  $\alpha$  resultante está codificada por una combinación específica de segmentos VJ (secuencia Va/J $\alpha$ ); y el locus génico variable del TCR $\beta$  experimenta un reordenamiento, de manera que la cadena TCR  $\beta$  resultante está codificada por una combinación específica de segmentos VDJ (secuencia V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$ ).

Las interacciones con estroma tímico estimulan timocitos que experimentan diversas fases de desarrollo, caracterizadas por la expresión de diversos marcadores de la superficie celular. En la Tabla 1 se presenta un sumario de marcadores de la superficie celular característicos en diversas fases de desarrollo en el timo. El reordenamiento en el locus génico variable del TCR $\beta$  comienza en la fase DN2 y finaliza durante la fase DN4, mientras que el reordenamiento en el locus génico variable del TCR $\alpha$  se produce en la fase DP. Después de la finalización del reordenamiento del locus del TCR $\beta$ , las células expresan la cadena de TCR $\beta$  en la superficie celular junto con la cadena  $\alpha$  sustituta, pT $\alpha$ . Véase, Janeway's Immunobiology, Capítulo 7, 7ª Ed., Murphy *et al.* eds., Garland Science, 2008.

**Tabla 1: Fases de desarrollo de los linfocitos T en el timo**

| Fase de desarrollo | DN1         | DN2         | DN3                         | DN4           | PD        | SP          |
|--------------------|-------------|-------------|-----------------------------|---------------|-----------|-------------|
| Marcador(es)       | CD44+/CD25- | CD44+/CD25+ | CD44 <sup>bajo</sup> /CD25+ | CD44- / CD25- | CD4+/CD8+ | CD4+ o CD8+ |

Los linfocitos T CD4+ y CD8+ no expuestos a tratamiento anteriormente salen del timo y penetran en los órganos linfoides periféricos (por ejemplo, el bazo) donde se exponen a antígenos y se activan para expandirse por clonación y diferenciarse en numerosos linfocitos T efectoras (Tef), por ejemplo, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T<sub>REG</sub>, linfocitos T<sub>H</sub>17, linfocitos T<sub>H</sub>1, linfocitos T<sub>H</sub>2, etc. Después de la infección, varios linfocitos T persisten como linfocitos T de memoria, y se clasifican como linfocitos T de memoria central (T<sub>mc</sub>) o linfocitos T de memoria efectora (T<sub>me</sub>). Sallusto *et al.* (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions, Nature 401: 708-12 y el Comentario de Mackay (1999) Dual personality of memory T cells, Nature 401: 659-60. Sallusto y sus colaboradores propusieron que, después de la infección inicial, los linfocitos T<sub>cm</sub> representan un combinado fácilmente disponible de linfocitos T de memoria cebados con antígenos en los tejidos periféricos con funciones efectoras, aunque los linfocitos T<sub>cm</sub> representan linfocitos T de memoria cebados con antígenos en los órganos linfoides periféricos que tras un estímulo secundario pueden llegar a ser nuevos linfocitos T efectoras. Aunque todos los linfocitos T de memoria expresan la isoforma CD45RO de CD45 (los linfocitos T no tratados anteriormente expresan la isoforma CD45RA), los T<sub>cm</sub> se caracterizan por la expresión de la L-selectina (conocida también como CD62L) y CCR7+, que son importantes para la unión y la señalización en los órganos linfoides y en los ganglios linfáticos. Véase anteriormente. Por lo tanto,

todos los linfocitos T que se encuentran en los órganos linfoides periféricos (por ejemplo, linfocitos T no tratados anteriormente, células Tmc, etc.) expresan CD62L. Además de CD45RO, se sabe que todos los linfocitos T de memoria expresan numerosos marcadores de la superficie celular diferentes, por ejemplo, CD44. Para consultar un sumario de los diversos marcadores de superficie en linfocitos T, véase Janeway's Immunobiology, Capítulo 10, citado anteriormente.

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

Las cadenas CD3 y  $\zeta$  del complejo ensamblado proporcionan componentes para la señalización del TCR como el heterodímero TCR $\alpha\beta$  (o heterodímero TCR $\gamma\delta$ ) que por sí mismo carece de actividad transductora de la señalización. Las cadenas CD3 poseen cada una un Motivo de activación basado en la tirosina del inmunorreceptor (ITAM, por sus siglas en inglés), mientras que la cadena  $\zeta$  contiene tres ITAM en tándem. Los ITAM contienen restos de tirosina susceptibles de fosforilación por las cinasas asociadas. Por lo tanto, el complejo TCR-CD3 ensamblado contiene 10 motivos ITAM. Véase, por ejemplo, Love y Hayes (2010) ITAM-Mediated Signaling by the T-Cell Antigen Receptor, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:e002485. Después del acoplamiento del TCR, los motivos ITAM son fosforilados por las tirosina cinasas de la familia Src, Lck y Fyn, lo que inicia una cascada de señalización, dando como resultado la activación de Ras, la movilización del calcio, los reordenamientos del citoesqueleto de la actina y la activación de los factores de transcripción, conduciendo todo en última instancia a la diferenciación, la proliferación y las acciones efectoras de los linfocitos T. Véase anteriormente, véase también, Janeway's Immunobiology, citado anteriormente.

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

Se conocen en la técnica ratones transgénicos para las secuencias del receptor de linfocitos T reordenadas. La presente divulgación se refiere a roedores modificados por ingeniería genética (por ejemplo, ratas, ratones) que comprenden loci de genes variables que comprenden loci de genes variables de linfocitos T humanos o humanizados reordenados que son capaces de reordenarse para formar secuencias de ácido nucleico que codifican dominios variables receptores de linfocitos T humanos, incluyendo animales que comprenden linfocitos T que comprenden dominios variables humanos reordenados y regiones constantes de roedor (por ejemplo, de ratón o de rata). La presente divulgación proporciona también animales no humanos (por ejemplo, ratas, ratones) que son capaces de generar un repertorio diverso de secuencias variables receptoras de linfocitos T humanos; por lo tanto, la presente divulgación proporciona roedores que expresan TCR con dominios variables totalmente humanos en respuesta a un antígeno de interés y que se unen a un epítipo del antígeno de interés. En algunas realizaciones, se proporcionan animales no humanos que generan un repertorio diverso de receptores de linfocitos T capaces de reaccionar con diversos antígenos, incluyendo, pero sin limitación, antígenos presentados por APC.

En una realización, la divulgación proporciona roedores modificados genéticamente (por ejemplo, ratas, ratones) que comprenden en su genoma segmentos de la región variable del TCR humanos sin reordenar (segmentos (V(D)J), en donde los segmentos de la región variable del TCR humanos sin reordenar reemplazan, en un locus génico variable del TCR de roedor endógeno (por ejemplo, el locus génico variable del TCR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y/o  $\gamma$ ), los segmentos de la región variable del TCR de roedor endógenos. En una realización, el locus génico variable del TCR humano sin reordenar reemplaza el locus génico variable del TCR de roedor endógeno.

En otra realización, la invención proporciona un roedor modificado genéticamente (por ejemplo, ratas, ratones) que

comprenden en su genoma segmentos de la región variable del TCR humanos sin reordenar (segmentos (V(D)J), en donde los segmentos de la región variable del TCR humanos sin reordenar están unidos operativamente a una secuencia génica de la región constante del TCR de roedor para formar un locus del TCR humanizado, en donde el locus del TCR humanizado está en un sitio en el genoma distinto del locus del TCR de roedor endógeno. Por lo tanto, en una realización, se proporciona también un roedor (roedor, por ejemplo, ratón, rata) que comprende un transgén que comprende segmentos de la región variable del TCR humanos sin reordenar unidos operativamente a la secuencia de la región constante del TCR no humana.

En un aspecto, los roedores modificados genéticamente comprenden en su genoma segmentos de la región variable del TCR humanos, al tiempo que retienen la secuencia o secuencias génicas constantes del TCR de roedor (por ejemplo, ratón, rata) que codifican dominios constantes del TCR. En diversas realizaciones, un dominio constante del TCR incluye el dominio transmembrana y la cola citoplasmática del TCR. Por lo tanto, en diversas realizaciones, los roedores modificados genéticamente retienen el dominio transmembrana del TCR no humano endógeno y la cola citoplasmática. En otras realizaciones, los roedores comprenden secuencias génicas constantes del TCR no endógenas de roedor, por ejemplo, que codifican el dominio transmembrana del TCR no endógeno de roedor y la cola citoplasmática. Como se ha indicado anteriormente, la región constante del TCR participa en la cascada de señalización iniciada durante la activación de los linfocitos T cebados con antígenos; por lo tanto, el dominio constante del TCR endógeno interactúa con una diversidad de proteínas de anclaje y señalización no humanas en los linfocitos T. Por lo tanto, los roedores modificados genéticamente expresan receptores de linfocitos T humanizados que retienen la capacidad de reclutar una diversidad de moléculas de anclaje o señalización no humanas endógenas, por ejemplo, moléculas CD3 (por ejemplo, CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ ), la cadena  $\zeta$ , Lck, Fyn, ZAP-70, etc. Se describe una lista no limitante de moléculas que se reclutan para el complejo TCR en Janeway's Immunobiology, citado anteriormente. Se cree que la capacidad de los procesos de desarrollo de linfocitos T y diferenciación de linfocitos T en animales no humanos para transcurrir y permitir una respuesta inmunitaria sólida puede deberse, al menos en parte, a la colocación de regiones variables en los loci de ratón endógenos y al mantenimiento de dominios constantes de ratón.

En algunas realizaciones, se desvela un roedor que comprende en su genoma segmentos de la región variable del TCR $\alpha$  humanos sin reordenar, en donde los segmentos de la región variable del TCR $\alpha$  humanos sin reordenar están unidos operativamente a una secuencia génica de la región constante del TCR $\alpha$  de roedor para formar un locus del TCR $\alpha$  humanizado. En una realización, el locus del TCR $\alpha$  humanizado está en un sitio en el genoma distinto del locus del TCR $\alpha$  no humano endógeno. En otra realización, los segmentos de la región variable del TCR $\alpha$  humano sin reordenar reemplazan los segmentos de la región variable del TCR $\alpha$  no humano endógeno reteniendo al mismo tiempo la secuencia o secuencias génicas de la región constante del TCR $\alpha$  no humano endógeno. En una realización, el locus génico variable del TCR $\alpha$  humano sin reordenar reemplaza el locus génico variable del TCR $\alpha$  no humano endógeno. En algunas realizaciones, el reemplazo de un locus génico de la región variable del TCR $\alpha$  de roedor endógeno con el locus génico variable del TCR $\alpha$  humano sin reordenar comprende una supresión o inactivación de un locus génico variable del TCR $\delta$ . En otras realizaciones, el reemplazo de un gen de la región variable del TCR $\alpha$  de roedor endógeno con el locus génico del TCR $\alpha$  humano sin reordenar comprende un reemplazo de un locus génico variable del TCR $\delta$  endógeno con segmentos de la región variable del TCR $\delta$  humanos sin reordenar. El animal puede retener la secuencia o secuencias génicas de la región variable y de la región constante del TCR $\beta$  no humanas endógenas. Por lo tanto, el animal comprende un TCR que comprende una cadena TCR $\alpha$  quimérica humana/no humana (es decir, humanizada) y una cadena TCR $\beta$  no humana.

En algunas realizaciones, se proporciona un roedor que comprende en su genoma segmentos de la región variable del TCR $\delta$  humanos sin reordenar, en donde los segmentos de la región variable del TCR $\delta$  humanos sin reordenar están unidos operativamente a una secuencia génica de la región constante del TCR $\delta$  no humana dando como resultado un locus del TCR $\delta$  humanizado. En una realización, el locus del TCR $\delta$  humanizado está en un sitio en el genoma distinto del locus del TCR $\delta$  no humano endógeno. En otra realización, los segmentos de la región variable del TCR $\delta$  humanos sin reordenar reemplazan los segmentos de la región variable del TCR $\delta$  no humanos endógenos reteniendo al mismo tiempo la secuencia o secuencias génicas de la región constante del TCR $\delta$  no humanas endógenas. En una realización, el locus génico variable del TCR $\delta$  humano sin reordenar reemplaza el locus génico variable del TCR $\delta$  de roedor endógeno.

Se proporciona un roedor que comprende en su genoma segmentos de la región variable del TCR $\beta$  humanos sin reordenar, en donde los segmentos de la región variable del TCR $\beta$  humanos sin reordenar están unidos operativamente a una secuencia génica de la región constante del TCR $\beta$  no humana dando como resultado un locus del TCR $\beta$  humanizado. En una realización, el locus del TCR $\beta$  humanizado está en un sitio en el genoma distinto del locus del TCR $\beta$  no humano endógeno. En otra realización, los segmentos de la región variable del TCR $\beta$  humanos sin reordenar reemplazan los segmentos de la región variable del TCR $\beta$  de roedor endógenos reteniendo al mismo tiempo la secuencia o secuencias de la región constante del TCR $\beta$  de roedor endógenas. En una realización, el locus génico variable del TCR $\beta$  humano sin reordenar reemplaza el locus génico variable del TCR $\beta$  de roedor endógeno. En algunas realizaciones, el animal retiene la secuencia o secuencias de la región variable y de la región constante del TCR $\alpha$  no humanas endógenas. Por lo tanto, el animal expresa un TCR que comprende una cadena TCR $\beta$  quimérica humana/de roedor (es decir, humanizada) y una cadena TCR $\alpha$  de roedor.

En algunas realizaciones específicas, la divulgación proporciona un animal no humano modificado genéticamente (por



ejemplo, roedor, por ejemplo, ratón o rata) que comprende en su genoma (a) un locus génico variable  $\alpha$  de un receptor de linfocitos T (TCR) sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\alpha$  humano y al menos un segmento J $\alpha$  humano, unido operativamente a una secuencia o secuencias génicas constantes del TCR $\alpha$  no humanas (por ejemplo, de roedor, por ejemplo, de ratón o rata) endógenas, (b) un locus génico variable del TCR $\beta$  sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\beta$  humano, al menos un segmento D $\beta$  humano, y al menos un segmento J $\beta$  humano, unido operativamente a una secuencia o secuencias de la región constante del TCR $\beta$  no humanas endógenas (por ejemplo, de roedor, por ejemplo, de ratón o rata) y/o (c) un locus génico variable del TCR $\delta$  sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\delta$  humano, al menos un segmento D $\delta$  humano, y al menos un segmento J $\delta$  humano, unido operativamente a una secuencia génica de la región constante del TCR $\delta$  no humana (por ejemplo, de roedor, por ejemplo, de ratón o rata) endógena. Otro roedor que se proporciona en el presente documento comprende en su genoma (a) un locus génico variable  $\alpha$  del receptor de linfocitos T (TCR) sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\alpha$  humano y al menos un segmento J $\alpha$  humano, unido operativamente a una secuencia o secuencias constantes del TCR $\alpha$  no humanas (por ejemplo, de roedor, por ejemplo, de ratón o rata) endógenas, (b) un locus génico variable del TCR $\beta$  sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\beta$  humano, al menos un segmento D $\beta$  humano, y al menos un segmento J $\beta$  humano, unido operativamente a una secuencia o secuencias génicas constantes del TCR $\beta$  no humanas (por ejemplo, de roedor, por ejemplo, de ratón o rata) endógenas, (c) un locus génico variable del TCR $\delta$  sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\delta$  humano, al menos un segmento D $\delta$  humano, y al menos un segmento J $\delta$  humano, unido operativamente a una secuencia o secuencias de la región constante del TCR $\delta$  no humanas endógenas (por ejemplo, de roedor, por ejemplo, de ratón o rata) y/o (d) un locus génico variable del TCR $\gamma$  sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\gamma$  humano, y al menos un segmento J $\gamma$  humano, unido operativamente a una secuencia génica de la región constante del TCR $\gamma$  no humana (por ejemplo, de roedor, por ejemplo, de ratón o rata) endógena.

En diversas realizaciones, el locus génico variable del TCR humano o humanizado sin reordenar (el locus génico variable del TCR $\alpha$ , TCR $\beta$  y/o TCR $\delta$ ) está comprendido en la estirpe germinal del roedor, por ejemplo, ratón o rata). En diversas realizaciones, los reemplazos de segmentos V(D)J del TCR por segmentos V(D)J del TCR humanos sin reordenar (por ejemplo, segmentos V $\alpha$  y J $\alpha$ ; V $\beta$  y D $\beta$  y J $\beta$ ; V $\delta$  y D $\delta$  y J $\delta$ ; Y $\gamma$  y J $\gamma$  pueden estar en un locus (o loci) variable del TCR no humano endógeno, en donde los segmentos V y J y/o V y D y J humanos sin reordenar están unidos operativamente a secuencias génicas de la región constante del TCR no humanas.

En algunas realizaciones, el animal no humano comprende dos copias del locus génico variable del TCR $\alpha$  humano o humanizado sin reordenar, dos copias del locus génico variable del TCR $\beta$  humano o humanizado sin reordenar y/o dos copias del locus génico variable del TCR $\delta$  humano o humanizado sin reordenar. Por lo tanto, el roedor es homocigoto para uno o más loci génicos variables del TCR $\alpha$ , TCR $\beta$  y/o TCR $\delta$  humanos o humanizados sin reordenar. En algunas realizaciones, el roedor comprende una copia del locus génico variable del TCR $\alpha$  humano o humanizado sin reordenar, una copia del locus génico variable del TCR $\beta$  humano o humanizado sin reordenar y/o una copia del locus génico variable del TCR $\delta$  humano o humanizado sin reordenar. Por lo tanto, el animal no humano es heterocigoto para un locus génico variable del TCR $\alpha$ , TCR $\beta$  y/o TCR $\delta$  humano o humanizado sin reordenar. En otra realización, un animal no humano es heterocigoto u homocigoto para el locus génico variable del TCR $\gamma$  humano o humanizado sin reordenar.

En una realización, el locus génico variable del TCR $\alpha$  sin reordenar que comprende segmentos de la región variable humanos (por ejemplo, segmentos V $\alpha$  y J $\alpha$  humanos) se sitúa en el genoma de roedor de manera que los segmentos de la región variable humanos reemplazan los segmentos de la región variable de roedor correspondientes. En una realización, el locus génico variable del TCR $\alpha$  sin reordenar que comprende los segmentos de la región variable humanos reemplaza el locus génico variable del TCR $\alpha$  endógeno. En un aspecto, los segmentos V $\alpha$  y J $\alpha$  endógenos de roedor son incapaces de reordenarse para formar una secuencia V $\alpha$ /J $\alpha$  reordenada. Por lo tanto, en un aspecto, los segmentos V $\alpha$  y J $\alpha$  humanos en el locus génico variable del TCR $\alpha$  sin reordenar son capaces de reordenarse para formar una secuencia V $\alpha$ /J $\alpha$  humana sin reordenar.

De forma similar, en una realización, el locus génico variable del TCR $\beta$  sin reordenar que comprende segmentos de la región variable humanos (por ejemplo, segmentos V $\beta$ , D $\beta$ , y J $\beta$  humanos) se sitúa en el genoma de roedor de manera que los segmentos de la región variable humanos reemplazan los segmentos de la región variable de roedor correspondientes. En una realización, el locus génico variable del TCR $\beta$  sin reordenar que comprende segmentos de la región variable humanos reemplaza el locus génico variable del TCR $\beta$  endógeno. En un aspecto, los segmentos V $\beta$ , D $\beta$  y J $\beta$  de roedor endógenos son incapaces de reordenarse para formar una secuencia V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$  reordenada. Por lo tanto, en un aspecto, los segmentos V $\beta$ , D $\beta$ , y J $\beta$  en el locus del gen TCR $\beta$  variable sin reordenar son capaces de reordenarse para formar una secuencia V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$  humana reordenada.

En una realización, el locus génico variable del TCR $\delta$  sin reordenar que comprende segmentos de la región variable humanos (por ejemplo, segmentos V $\delta$ , D $\delta$  y J $\delta$  humanos) se sitúa en el genoma de roedor de tal manera que los segmentos de la región variable humana sustituyen los segmentos de la región variable de roedor correspondientes. En una realización, el locus génico variable del TCR $\delta$  sin reordenar que comprende segmentos de la región variable humanos reemplaza el locus génico variable del TCR $\delta$  endógeno. En un aspecto, los segmentos V $\delta$ , D $\delta$ , y J $\delta$  no humanos endógenos son incapaces de reordenarse para formar una secuencia V $\delta$ /D $\delta$ /J $\delta$  reordenada. Por lo tanto, en un aspecto, los segmentos V $\delta$ , D $\delta$ , y J $\delta$  en el locus del gen TCR $\delta$  variable sin reordenar son capaces de reordenarse

para formar una secuencia V $\delta$ /D $\delta$ /J $\delta$  humana reordenada.

En una realización, el locus génico variable del TCR $\gamma$  sin reordenar que comprende segmentos de la región variable humanos (por ejemplo, segmentos V $\gamma$  y J $\gamma$  humanos) se sitúa en el genoma de roedor de manera que los segmentos de la región variable humanos reemplazan los segmentos de la región variable de roedor correspondientes. En una realización, el locus génico variable del TCR $\gamma$  sin reordenar que comprende segmentos de la región variable humanos reemplaza el locus génico variable del TCR $\gamma$  endógeno. En un aspecto, los segmentos V $\alpha$  y J $\alpha$  endógenos de roedor son incapaces de reordenarse para formar una secuencia V $\gamma$ /J $\gamma$  reordenada. Por lo tanto, en un aspecto, los segmentos V $\gamma$  y J $\gamma$  humanos en el locus génico variable del TCR $\gamma$  sin reordenar son capaces de reordenarse para formar una secuencia V $\gamma$ /J $\gamma$  humana sin reordenar.

En otra realización más, los loci génicos variables del TCR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y/o  $\gamma$  sin reordenar que comprenden segmentos de la región variable humanos reemplazan los loci génicos variables de TCR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  endógenos respectivos. En un aspecto, los segmentos V $\alpha$  y J $\alpha$  endógenos de roedor son incapaces de reordenarse para formar una secuencia V $\alpha$ /J $\alpha$  reordenada, los segmentos V $\beta$ , D $\beta$  y J $\beta$  de roedor endógenos son incapaces de reordenarse para formar una secuencia V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$  reordenada, los segmentos V $\delta$ , D $\delta$  y J $\delta$  son incapaces de reordenarse para formar una secuencia V $\delta$ /D $\delta$ /J $\delta$  reordenada y/o los segmentos V $\gamma$  y J $\gamma$  de roedor endógenos son incapaces de reordenarse para formar una secuencia V $\gamma$ /J $\gamma$  reordenada. Por lo tanto, en un aspecto, los segmentos V $\alpha$  y J $\alpha$  humanos en el locus génico variable del TCR $\alpha$  sin reordenar son capaces de reordenarse para formar una secuencia V $\alpha$ /J $\alpha$  humana sin reordenar, los segmentos V $\beta$ , D $\beta$ , y J $\beta$  en el locus del gen TCR $\beta$  variable sin reordenar son capaces de reordenarse para formar una secuencia V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$  humana reordenada, los segmentos V $\delta$ , D $\delta$  y J $\delta$  humanos en el locus génico variable del TCR $\delta$  sin reordenar son capaces de reordenarse para formar una secuencia V $\delta$ /D $\delta$ /J $\delta$  humana reordenada y/o los segmentos V $\gamma$  y J $\gamma$  humanos en el locus génico variable del TCR $\alpha$  sin reordenar son capaces de reordenarse para formar una secuencia V $\gamma$ /J $\gamma$  humana reordenada.

En algunos aspectos, el roedor que comprende un locus génico del TCR $\alpha$ , TCR $\beta$  y/o TCR  $\delta$  humanizado (que comprende un locus génico variable del TCR $\alpha$ , TCR $\beta$  y/o TCR  $\delta$  humano sin reordenar) retiene un locus génico variable del TCR $\alpha$  TCR $\beta$  y/o TCR $\delta$  de roedor endógeno. El locus génico variable del TCR $\alpha$ , TCR $\beta$  y/o TCR $\delta$  de roedor endógeno es un locus no funcional. En una realización, el locus no funcional es un locus inactivado, por ejemplo, un locus invertido (por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico codificante del locus génico variable está en orientación invertida con respecto a la secuencia de la región constante, de manera que no son posibles reordenamientos satisfactorios usando segmentos de la región variable del locus invertido). En una realización, el locus génico variable del TCR $\alpha$ , TCR $\beta$  y/o TCR  $\delta$  humanizado se sitúa entre el locus génico variable del TCR $\alpha$ , TCR $\beta$  y/o TCR  $\delta$  de roedor endógeno y el locus génico constante del TCR $\alpha$ , TCR $\beta$  y/o TCR  $\delta$  de roedor endógeno, respectivamente. Pueden realizarse ordenamientos cromosómicos similares para colocar TCR $\gamma$  humano o humanizado en el genoma de un roedor, por ejemplo, en un locus del TCR $\gamma$ .

El número, nomenclatura, posición, así como otros aspectos de los segmentos V y J y/o V, D y J de los loci del TCR humanos y de ratón pueden dilucidarse usando la base de datos IMGT, disponible en el sitio web del Sistema Internacional de Información Inmunogenética (IMGT). El locus variable del TCR $\alpha$  de ratón tiene aproximadamente 1,5 megabases y comprende un total de 100 segmentos V $\alpha$  y 60 segmentos J $\alpha$ . El locus variable del TCR $\alpha$  humano tiene aproximadamente 1 megabase y comprende un total de 54 segmentos V $\alpha$  y 61 segmentos J $\alpha$ , creyéndose que 45V $\alpha$  y 50J $\alpha$  son funcionales. A menos que se indique lo contrario, los números de los segmentos V(D)J humanos a los que se hace referencia en toda la memoria descriptiva se refieren al número total de segmentos V(D)J. El roedor modificado genéticamente, por ejemplo, ratón o rata, comprende al menos un segmento V $\alpha$  humano y al menos un segmento J $\alpha$  humano. En una realización, el roedor comprende un locus del TCR $\alpha$  humanizado que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 23, 25, 30, 35, 40, 45, 48, 50 o hasta 54 segmentos V $\alpha$  humanos. En algunas realizaciones, el locus del TCR $\alpha$  humanizado comprende 2, 8, 23, 35, 48 o 54 segmentos V $\alpha$  humanos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el locus del TCR $\alpha$  humanizado en el roedor puede comprender el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o el 100 % de V $\alpha$  humano; en algunas realizaciones, puede comprender aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 90 % o el 100 % de V $\alpha$  humano.

En una realización, el roedor comprende un locus del TCR $\alpha$  que comprende un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de V $\alpha$ 40 a V $\alpha$ 41 humanos (el segmento V $\alpha$  se denomina también "TRAV" o "TCRAV") y un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de 61 segmentos J $\alpha$  humanos (el segmento J $\alpha$  se denomina también "TRAJ" o "TCRAJ"). El roedor comprende un locus del TCR $\alpha$  humanizado que comprende un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de TRAV35 a TRAV41 humanos y un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de 61 TRAJ humanos. En una realización, el roedor comprende un locus del TCR $\alpha$  humanizado que comprende un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de TRAV22 a TRAV41 humanos y un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de 61 TRAJ humanos. En una realización, el roedor comprende un locus del TCR $\alpha$  humanizado que comprende un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de TRAV13-2 a TRAV41 humanos y un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de 61 TRAJ humanos. En una realización, el roedor comprende un locus del TCR $\alpha$  humanizado que comprende un fragmento de ADN que comprende una

secuencia humana contigua de TRAV6 a TRAV41 humanos y 61 TRAJ humanos. En una realización, el animal no humano comprende un locus del TCR $\alpha$  humanizado que comprende un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de TRAV1-1 a TRAV 41 humanos y 61 TRAJ humanos. En diversas realizaciones, los fragmentos de ADN que comprenden secuencias humanas contiguas de segmentos de la región variable del TCR $\alpha$  humanos comprenden también sitios de enzimas de restricción, casetes de selección, sitios de endonucleasas, u otros sitios insertados para facilitar la clonación y la selección durante el proceso de humanización del locus. En diversas realizaciones, estos sitios adicionales no interfieren con el funcionamiento adecuado (por ejemplo, reordenamiento, corte y empalme, etc.) de diversos genes en el locus del TCR $\alpha$ .

En una realización, el locus del TCR $\alpha$  humanizado comprende 61 segmentos J $\alpha$  humanos o el 100 % de segmentos J $\alpha$  humanos. En una realización particular, el locus del TCR $\alpha$  humanizado comprende 8 segmentos V $\alpha$  humanos y 61 segmentos J $\alpha$  humanos; en otra realización particular, el locus del TCR $\alpha$  humanizado comprende 23 segmentos V $\alpha$  humanos y 61 segmentos J $\alpha$  humanos. En otra realización particular, el locus del TCR $\alpha$  humanizado comprende un repertorio completo de segmentos V $\alpha$  y J $\alpha$  humanos, es decir, todos los segmentos génicos de la región  $\alpha$  variable humana codificados por el locus  $\alpha$ , o 54 segmentos V $\alpha$  humanos y 61 segmentos J $\alpha$  humanos. En diversas realizaciones, el roedor no comprende ningún segmento V $\alpha$  o J $\alpha$  no humano endógeno en el locus del TCR $\alpha$ .

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

En una realización, el animal no humano comprende un locus del TCR $\beta$  humanizado que comprende un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de segmentos V $\beta$ 18 a V $\beta$ 29-1 humanos (el segmento V $\beta$  también se denomina "TRBV" o "TCRBV"). En una realización, el roedor comprende un locus del TCR $\beta$  humanizado que comprende un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de TRBV18 a TRBV29-1 humanos, un fragmento que comprende una secuencia humana contigua de D $\beta$ 1-J $\beta$ 1 humanos (es decir, segmentos D $\beta$ 1-J $\beta$ 1-1-J $\beta$ 1-6 humanos), y un fragmento de ADN separado que comprende una secuencia humana contigua de D $\beta$ 2-J $\beta$ 2 humanos (es decir, segmentos D $\beta$ 2-J $\beta$ 2-1-J $\beta$ 2-7 humanos). En una realización, el roedor comprende un locus del TCR $\beta$  humanizado que comprende un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de TRBV6-5 a TRBV29-1 humanos, un fragmento que comprende una secuencia humana contigua de D $\beta$ 1-J $\beta$ 1 humanos (es decir, segmentos D $\beta$ 1-J $\beta$ 1-1-J $\beta$ 1-6 humanos), y un fragmento de ADN separado que comprende una secuencia humana contigua de D $\beta$ 2-J $\beta$ 2 humanos (es decir, segmentos D $\beta$ 2-J $\beta$ 2-1-J $\beta$ 2-7 humanos). En una realización, el roedor comprende un locus del TCR $\beta$  humanizado que comprende un fragmento de ADN que comprende una secuencia humana contigua de TRBV1 a TRBV29-1 humanos, un fragmento que comprende una secuencia humana contigua de D $\beta$ 1-J $\beta$ 1 humanos, un fragmento de ADN separado que comprende una secuencia humana contigua de D $\beta$ 2-J $\beta$ 2 humanos y un fragmento de ADN separado que comprende la secuencia de TRBV30 humano. En diversas realizaciones, los fragmentos de ADN que comprenden secuencias humanas contiguas de segmentos de la región variable del TCR $\beta$  humanos comprenden también sitios de enzimas de restricción, casetes de selección, sitios de endonucleasas, u otros sitios insertados para facilitar la clonación y la selección durante el proceso de humanización del locus. En diversas realizaciones, estos sitios adicionales no interfieren con el funcionamiento adecuado (por ejemplo, reordenamiento, corte y empalme, etc.) de diversos genes en el locus del TCR $\beta$ .

En una realización, el locus del TCR $\beta$  humanizado comprende 14 segmentos J $\beta$  humanos, o el 100 % de segmentos J $\beta$  humanos, y 2 segmentos D $\beta$  humanos o el 100 % de segmentos J $\beta$  humanos. En otra realización, el locus del TCR $\beta$  humanizado comprende al menos un segmento V $\beta$  humano, por ejemplo, 14 segmentos V $\beta$  humanos, y todos los segmentos D $\beta$  y J $\beta$  de ratón, el locus del TCR $\beta$  humanizado comprende 14 segmentos V $\beta$  humanos, 2 segmentos D $\beta$  humanos, y 14 segmentos J $\beta$  humanos. En otra realización particular, el locus del TCR $\beta$  humanizado comprende un repertorio completo de segmentos V $\beta$ , D $\beta$  y J $\beta$  humanos, es decir, todos los segmentos génicos de la región  $\beta$  variable humanos codificados por el locus  $\beta$  o los 67 segmentos V $\beta$  humanos, 2 D $\beta$  humanos y 14 J $\beta$  humanos. En una realización, el roedor comprende un segmento V $\beta$  de roedor (por ejemplo, 5') en el locus del TCR $\beta$  humanizado. En diversas realizaciones, el roedor no comprende ningún segmento V $\beta$ , D $\beta$  o J $\beta$  no humano endógeno en el locus del TCR $\beta$ .

En diversas realizaciones, en donde el roedor comprende un repertorio de segmentos de la región variable de los TCR $\alpha$  y TCR $\beta$  humanos (y opcionalmente los TCR $\delta$  y TCR $\gamma$  humanos) (por ejemplo, un repertorio completo de segmentos de la región variable), el repertorio de diversos segmentos (por ejemplo, el repertorio completo de diversos segmentos) se utiliza por el animal para generar un repertorio diverso de moléculas de TCR contra diversos antígenos.

En diversos aspectos, el roedor comprende porciones contiguas de los loci variables del TCR genómico humano que comprenden segmentos V, D y J, o D y J, o V y J, o V dispuestos como en un locus variable genómico humano sin reordenar, por ejemplo, que comprende secuencias promotoras, secuencias líderes, secuencias intergénicas, secuencias reguladoras, etc., ordenadas en un locus variable del TCR genómico humano. En otros aspectos, los diversos segmentos se ordenan como en un locus variable del TCR genómico de roedor sin reordenar. En diversas realizaciones del locus  $\alpha, \beta, \delta$  y/o  $\gamma$  del TCR humanizado, el locus humanizado puede comprender dos o más segmentos genómicos humanos que no aparecen en un genoma humano yuxtapuesto, por ejemplo, un fragmento de segmentos V del locus variable humano ubicado en un genoma humano proximal a la región constante, yuxtapuesto con un fragmento de segmentos V del locus variable humano ubicado en un genoma humano en el extremo 5' del locus variable humano.

Tanto en ratón como en ser humano, los segmentos génicos del TCR $\delta$  se ubican con el locus del TCR $\alpha$  (véase la **FIG. 4A, superior**, región TCRD encuadrada). Los segmentos J y D del TCR $\delta$  se ubican entre los segmentos V $\alpha$  y J $\alpha$ , mientras que los segmentos V del TCR $\delta$  se intercalan a través del locus del TCR $\alpha$ , con la mayoría ubicada entre diversos segmentos V $\alpha$ . Se pueden determinar el número y las ubicaciones de diversos segmentos del TCR $\delta$  a partir de la base de datos IMGT. Debido al reordenamiento genómico de los segmentos génicos del TCR $\delta$  en el locus del TCR $\alpha$ , el reordenamiento satisfactorio en el locus del TCR $\alpha$  puede suprimir o inactivar los segmentos génicos del TCR $\delta$ .

En algunas realizaciones, un roedor que comprende un locus génico variable del TCR $\alpha$  humano sin reordenar también comprende al menos un segmento V $\delta$  humano, por ejemplo, hasta el repertorio completo de segmentos V $\delta$  humanos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el reemplazo del locus endógeno del gen del TCR $\alpha$  variable da como resultado un reemplazo de al menos un segmento V $\delta$  de roedor con un segmento V $\delta$  humano. En otras realizaciones, el roedor comprende un repertorio completo de segmentos V $\delta$ , D $\delta$  y J $\delta$  humanos en el locus del TCR $\alpha$  humanizado sin reordenar; en otras realizaciones más, el roedor comprende un locus del TCR $\delta$  humano sin reordenar en el locus del TCR $\alpha$  humanizado sin reordenar (es decir, un locus del TCR $\delta$  que incluye segmentos de la región variable humanos, así como un potenciador y una región constante humanos). Un ejemplo para la construcción de un locus del TCR $\alpha$  humanizado sin reordenar que comprende un locus del TCR $\delta$  sin reordenar completo se representa en la patente de los EE.UU. n.º 9.113.616.

En otra realización más, el roedor comprende además un locus del TCR $\gamma$  humanizado sin reordenar, por ejemplo, un locus del TCR $\gamma$  que comprende al menos un segmento V $\gamma$  humano y al menos uno J $\gamma$  humano (por ejemplo, un repertorio completo de segmentos de la región variable V $\gamma$  humana y J $\gamma$  humana). El locus del TCR $\gamma$  humano está en el cromosoma 7 humano, mientras que el locus del TCR $\gamma$  de ratón está en el cromosoma 13 de ratón. Véase la base de datos IMGT para más detalle sobre el locus del TCR $\gamma$ .

En un aspecto, el roedor (por ejemplo, ratón o rata) que comprende loci de genes variables de los TCR $\alpha$  y  $\beta$  humanizados (y, opcionalmente, loci de genes variables del TCR $\delta/\gamma$  humanizados) descrito en el presente documento expresa un receptor de linfocitos T humanizado que comprende una región variable humana y una región constante de roedor (por ejemplo, ratón o rata) en una superficie de un linfocito T. En algunos aspectos, el roedor es capaz de expresar un repertorio diverso de receptores de linfocitos T humanizados que reconocen una diversidad de antígenos presentados.

En diversas realizaciones, los polipéptidos del receptor de linfocitos T humanizados desvelados en el presente documento comprenden secuencias líder humanas. En realizaciones alternativas, las secuencias de ácido nucleico del receptor TCR humanizado se modifican por ingeniería genética de manera que los polipéptidos del TCR humanizados comprendan secuencias líderes no humanas.

Los polipéptidos del TCR humanizados descritos en el presente documento pueden expresarse bajo el control de elementos reguladores no humanos endógenos (por ejemplo, elementos reguladores de roedores), por ejemplo, un promotor, silenciador, potenciador, etc. Los polipéptidos del TCR humanizados descritos en el presente documento pueden expresarse de forma alternativa bajo el control de elementos reguladores humanos. En diversas realizaciones, los roedores descritos en el presente documento comprenden además todas las secuencias reguladoras y diferentes que se encuentran normalmente *in situ* en el genoma humano.

En diversas realizaciones, la región variable humana de la proteína TCR humanizada es capaz de interactuar con diversas proteínas sobre la superficie de la misma célula u otra célula. En una realización, la región variable humana del TCR humanizado interactúa con proteínas MHC (proteínas MHC de clase I o II) que presentan antígenos sobre la superficie de la segunda célula, por ejemplo, una célula presentadora de antígeno (APC, por sus siglas en inglés). En algunas realizaciones, la proteína MHC I o II es una proteína de roedor (por ejemplo, de ratón o rata). En otras realizaciones, la proteína MHC I o II es una proteína humana (o humanizada). En un aspecto, la segunda célula, por

ejemplo, la APC, es una célula no humana endógena que expresa una molécula del MHC humana o humanizada. En una realización distinta, la segunda célula es una célula humana que expresa una molécula del MHC humana.

En un aspecto, el roedor expresa un receptor de linfocitos T humanizado con una región constante no humana sobre la superficie de un linfocito T, en donde el receptor es capaz de interactuar con moléculas de roedor, por ejemplo, moléculas de anclaje o señalización expresadas en el linfocito T (por ejemplo, moléculas de CD3, la cadena  $\zeta$  u otras proteínas ancladas al TCR a través de las moléculas de CD3 o la cadena  $\zeta$ ). Por lo tanto, en un complejo celular que comprende (a) un linfocito T no humano que expresa (i) un TCR que comprende una cadena de TCR $\alpha$  humanizado como se describe en el presente documento y una cadena de TCR $\beta$  humanizado como se describe en el presente documento y (ii) un correceptor quimérico como se describe en el presente documento y (b) una célula presentadora de antígeno no humana que comprende un antígeno unido a un MHC I quimérico y/o MHC II quimérico como se describe en el presente documento. En una realización, las cadenas de TCR $\alpha$  y TCR $\beta$  constantes no humanas forman complejo con un homodímero de la cadena zeta ( $\zeta$ ) de roedor y heterodímeros de CD3. En una divulgación, el complejo celular es un complejo celular *in vivo*. En una divulgación, el complejo celular es un complejo celular *in vitro*.

en diversas realizaciones, los roedores (por ejemplo, ratones o ratas) desvelados en el presente documento producen linfocitos T que son capaces de experimentar un desarrollo tímico, progresando de DN1 a DN2 a DN3 a DN4 a DP y a linfocitos T SP CD4 o CD8. Dichos linfocitos T del roedor expresan moléculas de superficie celular normalmente producidas por un linfocito T durante una fase particular del desarrollo tímico (por ejemplo, CD25, CD44, Kit, CD3, pT $\alpha$ , etc.). Por lo tanto, en una realización, el roedor desvelado en el presente documento puede expresar pT $\alpha$  formando un complejo con TCR $\beta$  en la fase DN3 del desarrollo tímico. Los animales no humanos descritos en el presente documento expresan linfocitos T capaces de experimentar un desarrollo tímico para producir linfocitos T CD4+ y CD8+.

En diversas realizaciones, el roedor desvelado en el presente documento produce linfocitos T que son capaces de experimentar una diferenciación de linfocitos T en la periferia. En algunas realizaciones, los roedores desvelados en el presente documento son capaces de producir un repertorio de linfocitos T efectores, por ejemplo, CTL (linfocitos T citotóxicos), T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>REG</sub>, T<sub>H</sub>17, etc. Por lo tanto, en estas realizaciones, los roedores desvelados en el presente documento generan linfocitos T efectores que cumplen diferentes funciones típicas del tipo de linfocito T particular, por ejemplo, reconocer, unirse y responder a antígenos extraños. En diversas realizaciones, los roedores desvelados en el presente documento producen linfocitos T efectores que matan destruyen células que presentan fragmentos peptídicos de patógenos citosólicos expresados en el contexto de moléculas del MHC I; reconocer péptidos derivados de antígenos degradados en vesículas intracelulares y presentados por moléculas del MHC II en la superficie de macrófagos e inducir a los macrófagos a destruir microorganismos; producir citocinas que impulsan la diferenciación de los linfocitos B; activar los linfocitos B para producir anticuerpos opsonizantes; inducir a las células epiteliales a producir quimiocinas que reclutan neutrófilos en los sitios de infección; etc.

En realizaciones adicionales, los roedores desvelados en el presente documento comprenden linfocitos T CD3+ en la periferia, por ejemplo, en el bazo. En otros aspectos, los roedores desvelados en el presente documento son capaces de generar una población de linfocitos T de memoria en respuesta a un antígeno de interés. Por ejemplo, los animales no humanos generan tanto linfocitos T de memoria central (T<sub>mc</sub>) como linfocitos T de memoria efectora (T<sub>me</sub>) a un antígeno, por ejemplo, antígeno de interés (por ejemplo, antígeno que se está sometiendo a ensayo para el desarrollo de vacunas, etc.).

Las células DN1 y DN2 que no reciben suficientes señales (por ejemplo, señales Notch) pueden convertirse en linfocitos B, células mieloides (por ejemplo, células dendríticas), mastocitos y linfocitos NK. Véase, por ejemplo, Yashiro-Ohtani *et al.* (2010) Notch regulation of early thymocyte development, *Seminars in Immunology* 22:261-69. En algunas realizaciones, los roedores desvelados en el presente documento desarrollan linfocitos B, células mieloides (por ejemplo, células dendríticas), mastocitos y linfocitos NK. En algunas realizaciones, los roedores desvelados en el presente documento desarrollan una población de células dendríticas en el timo.

El tipo predominante de receptores de linfocitos T expresados en la superficie de los linfocitos T es TCR $\alpha/\beta$ , expresando la minoría de las células TCR $\delta/\gamma$ . En algunas realizaciones, los linfocitos T de los roedores que comprenden loci del TCR $\alpha$  y/o  $\beta$  humanizados presentan la utilización de los loci de los TCR $\alpha/\beta$  y TCR $\delta/\gamma$ , por ejemplo, utilización de los loci de los TCR $\alpha/\beta$  y TCR $\delta/\gamma$  que es similar a la del animal de tipo silvestre (por ejemplo, linfocitos T de los animales no humanos descritos en el presente documento expresan las proteínas TCR $\alpha/\beta$  y TCR $\delta/\gamma$  en proporciones comparables a las expresadas por los animales de tipo silvestre). Por lo tanto, en algunas realizaciones, los roedores que comprenden loci del TCR $\alpha/\beta$  humanizado y TCR $\delta/\gamma$  no humano endógeno presentan utilización de todos los loci.

#### **Moléculas del MHC humanas o humanizadas**

En el presente documento se desvelan animales no humanos modificados por ingeniería genética que coexpresan al menos un correceptor de linfocitos T humanizado, al menos un MHC humanizado que se asocia al correceptor de linfocitos T humanizado, y opcionalmente, un TCR humanizado, que tras reconocer y unirse al péptido presentado por el MHC humanizado, y en conjunto con el correceptor humanizado, proporciona señales de activación a la célula que

expresa el TCR humanizado y los polipéptidos del correceptores de linfocitos T quiméricos. En consecuencia, un animal no humano como se desvela en el presente documento comprende al menos uno de una primera, segunda y/o tercera secuencia de ácido nucleico, cada una de las cuales codifica un polipéptido del MHC humano o humanizado diferente seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido del MHC II  $\alpha$  humano o humanizado, un polipéptido del MHC II  $\beta$  humano o humanizado, y un polipéptido  $\alpha$  del MHC I humano o humanizado; el animal no humano también comprende opcionalmente una  $\beta$ 2 microglobulina humana o humanizada. El uso de las designaciones primera, segunda y tercera en el presente documento no deben interpretarse como limitantes de los animales no humanos desvelados en el presente documento que requieren las tres secuencias de ácido nucleico o la presencia de cualquiera de los polipéptidos del MHC humanos o humanizados en cualquier orden específico.

Un roedor como se desvela en el presente documento puede comprender, por ejemplo, una primera y una segunda secuencia de nucleótidos que codifican, por ejemplo, un polipéptido de CD8 $\alpha$  humano o quimérico y un polipéptido de CD8 $\beta$  humano o quimérico, un locus génico variable  $\alpha$  del receptor de linfocitos T (TCR) sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\alpha$  humano y al menos un segmento J $\alpha$  humano, unido operativamente a una secuencia génica constante del TCR $\alpha$  de roedor y/o un locus génico variable del TCR $\beta$  sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\beta$  humano, al menos un segmento D $\beta$  humano, y al menos un segmento J $\beta$  humano, unido operativamente a una secuencia génica constante del TCR $\beta$  de roedor, y opcionalmente una primera y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica, por ejemplo, un polipéptido  $\alpha$  del MHC I humano o humanizado y un polipéptido de  $\beta$ 2-microglobulina humano o humanizado. En otras realizaciones, un roedor como se desvela en el presente documento puede comprender, por ejemplo, una primera secuencia de nucleótidos que codifica, por ejemplo, un polipéptido de CD4 quimérico; un locus génico variable  $\alpha$  del receptor de linfocitos T (TCR) sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\alpha$  humano y al menos un segmento J $\alpha$  humano, unido operativamente a una secuencia génica constante del TCR $\alpha$  de roedor y/o un locus génico variable del TCR $\beta$  sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\beta$  humano, al menos un segmento D $\beta$  humano, y al menos un segmento J $\beta$  humano, unido operativamente a una secuencia génica constante del TCR $\beta$  de roedor; y opcionalmente una primera y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica, por ejemplo, un polipéptido del MHC II  $\alpha$  humano o humanizado y un polipéptido del MHC II  $\beta$  humano o humanizado. En alguna realización, un roedor como se desvela en el presente documento puede comprender, por ejemplo, una primera, segunda y tercera secuencias de nucleótidos que codifican, por ejemplo, un polipéptido de CD4 quimérico, un polipéptido de CD8 $\alpha$  quimérico y un polipéptido de CD8 $\beta$  quimérico; un locus génico variable  $\alpha$  del receptor de linfocitos T (TCR) sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\alpha$  humano y al menos un segmento J $\alpha$  humano, unido operativamente a una secuencia génica constante del TCR $\alpha$  de roedor y/o un locus génico variable del TCR $\beta$  sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\beta$  humano, al menos un segmento D $\beta$  humano, y al menos un segmento J $\beta$  humano, unido operativamente a una secuencia génica constante del TCR $\beta$  no humano; y una primera, segunda, tercera y cuarta secuencias de ácido nucleico que codifican, por ejemplo, un polipéptido del MHC II  $\alpha$  humano o humanizado, un polipéptido del MHC II  $\beta$  humano o humanizado, un polipéptido  $\alpha$  del MHC I humano o humanizado, y un polipéptido de  $\beta$ 2-microglobulina humano o humanizado.

En diversas realizaciones, en el presente documento se proporciona un roedor modificado genéticamente (por ejemplo, ratón o rata) que comprende en su genoma una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC I humano o humanizado y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína MHC II humana o humanizada. La secuencia de ácido nucleico del MHC I puede codificar un polipéptido del MHC I que es parcialmente humano y parcialmente de no humano, un polipéptido del MHC I quimérico de roedor humano, y la secuencia de ácido nucleico de MHC II puede codificar una proteína MHC II que es parcialmente humana y parcialmente de roedor, por ejemplo, proteína MHC II quimérica humana o no humana (por ejemplo, que comprende polipéptidos  $\alpha$  y  $\beta$  del MHC II quiméricos humano/no humano). En algunos aspectos, el animal no expresa polipéptidos del MHC I endógeno y del MHCII endógeno, por ejemplo, polipéptidos del MHC I y/o MHC II endógenos funcionales en una superficie celular. En algunas realizaciones, las únicas moléculas del MHC I y/o MHC II expresadas en la superficie celular del roedor son moléculas del MHC I y/o MHC II quiméricas.

Un animal no humano modificado genéticamente que comprende en su genoma, por ejemplo, en el locus endógeno, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC I quimérico humano/no humano se desvela en las publicaciones de patente de los EE.UU. n.º 20130111617 y 2013018581. Un animal no humano modificado genéticamente que comprende en su genoma, por ejemplo, en el locus endógeno, una secuencia de ácido nucleico que codifica polipéptidos del MHC II humanizados, por ejemplo, quiméricos humanos/no humanos, se desvela en la patente de los EE.UU. n.º 8.847.005 y en la publicación de patente de los EE.UU. n.º 20130185820. Un animal no humano modificado genéticamente que comprende en su genoma, por ejemplo, en el locus endógeno, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC I quimérico humano/no humano y que comprende en su genoma, por ejemplo, en el locus endógeno, una secuencia de ácido nucleico que codifica polipéptidos del MHC II humanizados, por ejemplo, quiméricos humanos/no humanos, se desvela en la publicación de patente de los EE.UU. n.º 20140245467.

En diversas realizaciones, en el presente documento se proporciona un roedor modificado genéticamente que comprende en su genoma, por ejemplo, en uno o más loci del MHC endógenos, una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC I quimérico humano/de roedor, en donde una porción humana del polipéptido del MHC I quimérico comprende una porción extracelular (o parte de la misma, por ejemplo, uno o más dominios extracelulares) de un polipéptido del MHC I humano; una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica

un polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico humano/de roedor, en donde una porción humana del polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico comprende una porción extracelular (o parte de la misma, por ejemplo, uno o más dominios extracelulares) de un polipéptido del MHC II  $\alpha$  humano; y/o una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico humano/de roedor, en donde una porción humana del polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico comprende una porción extracelular (o parte de la misma, por ejemplo, uno o más dominios extracelulares) de un polipéptido del MHC II  $\beta$  humano; en donde el roedor expresa proteínas MHC I y MHC II quiméricas humanas/de roedor funcionales a partir de su locus del MHC de roedor endógeno. En una realización, las secuencias de ácido nucleico primera, segunda y/o tercera se ubican respectivamente en los loci del MHC I, MHC II  $\alpha$  y MHC II  $\beta$  de roedor endógenos. En una realización, en donde el roedor es un ratón, las secuencias de ácidos nucleicos primera, segunda y/o tercera se ubican en el locus del MHC de ratón endógeno en el cromosoma 17 de ratón. En una realización, la primera secuencia de ácido nucleico se ubica en el locus del MHC I de roedor endógeno. En una realización, la segunda secuencia de ácido nucleico se ubica en el locus del MHC II  $\alpha$  de roedor endógeno. En una realización, la tercera secuencia de ácido nucleico se ubica en el locus del MHC II  $\beta$  de roedor endógeno.

En una realización, el roedor sólo expresa los polipéptidos del MHC I, MHC II  $\alpha$  y/o MHC II  $\beta$  quiméricos humanos/de roedor y no expresa polipéptidos del MHC de roedor endógeno (por ejemplo, polipéptidos I, II  $\alpha$  y/o II  $\beta$  del MHC endógenos funcionales a partir del locus del MHC de roedor endógeno. En una realización, el animal que se describe en el presente documento expresa un MHC I quimérico funcional y un MHC II quimérico funcional sobre la superficie de sus células, por ejemplo, células presentadoras de antígenos, etc. En una realización, los únicos MHC I y MHC II expresados por el animal en una superficie celular son MHC I quimérico y MHC II quimérico, y el animal no expresa ningún MHC I y MHC II endógeno en una superficie celular.

En una realización, el polipéptido del MHC I quimérico humano/no humano comprende en su porción humana una hendidura de unión al péptido, por ejemplo, de un polipéptido del MHC I humano. La porción humana del polipéptido quimérico comprende una porción extracelular de un MHC I humano. En esta realización, la porción humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de una cadena  $\alpha$  de un MHC I humano. En una realización, la porción humana del polipéptido quimérico comprende los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de un MHC I humano. En otra realización, la porción humana del polipéptido quimérico comprende los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de un MHC I humano.

En un aspecto, una porción humana del polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico y/o una porción humana del polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico comprende un dominio de unión a péptido de un polipéptido del MHC II  $\alpha$  humano y/o un polipéptido del MHC II  $\beta$  humano, respectivamente. La porción humana del polipéptido del MHC II  $\alpha$  y/o  $\beta$  quimérico comprende una porción extracelular de un polipéptido del MHC II  $\alpha$  y/o  $\beta$  humano, respectivamente. En una realización, una porción humana del polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico comprende el dominio  $\alpha 1$  de un polipéptido del MHC II  $\alpha$  humano; en otra realización, una porción humana del polipéptido del CMH II  $\alpha$  quimérico comprende los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de un polipéptido del CMH II  $\alpha$  humano. En una realización adicional, una porción humana del polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico comprende el dominio  $\beta 1$  de un polipéptido del MHC II  $\beta$  humano; en otra realización, una porción humana del polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico comprende los dominios  $\beta 1$  y  $\beta 2$  de un polipéptido del MHC II  $\beta$  humano.

En algunas realizaciones, el polipéptido del MHC I humano o humanizado puede derivar de una molécula de HLA humano funcional codificada por cualquiera de los loci de HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F y HLA-G. El polipéptido del MHC II humano o humanizado puede derivar de una molécula de HLA humano funcional codificada por cualquiera de los loci de HLA-DP, -DQ y -DR. Una lista de antígenos y alelos de HLA habitualmente utilizados se describe en Shankarkumar *et al.* ((2004) The Human Leukocyte Antigen (HLA) System, Int. J. Pharm. Genet. 4(2):91-103). Shankarkumar *et al.* también presentan una breve explicación de la nomenclatura de HLA utilizada en la técnica. Puede encontrarse información adicional con respecto a la nomenclatura de HLA y diversos alelos de HLA en Holdsworth *et al.* (2009) The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens, Tissue Antigens 73:95-170, y una reciente actualización de Marsh *et al.* (2010) Nomenclature for factors of the HLA system, 2010, Tissue Antigens 75:291-455. En algunas realizaciones, los polipéptidos del MHC I o MHC II pueden derivar de cualquier molécula de HLA-A, B, C, DR o DQ humano funcional. Por lo tanto, el polipéptido del MHC II humano o humanizado puede derivar de cualquiera de las moléculas de HLA humano funcional descritas en los mismos. En algunas realizaciones, todos los polipéptidos del MHC I y MHC II expresados en una superficie celular comprenden una porción derivada de moléculas HLA humano.

Un interés particular son las moléculas de HLA humano, los alelos de HLA polimórficos específicos, conocidos por estar asociados a una cantidad de enfermedades humanas, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias humanas. De hecho, se han identificado polimorfismos específicos en loci de HLA que se correlacionan con el desarrollo de artritis reumatoide, diabetes de tipo I, tiroiditis de Hashimoto, esclerosis múltiple, miastenia grave, enfermedad de Graves, lupus eritematoso sistémico, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y otros trastornos autoinmunitarios. Véase, por ejemplo, Wong y Wen (2004) What can the HLA transgenic mouse tell us about autoimmune diabetes?, Diabetologia 47:1476-87; Taneja y David (1998) HLA Transgenic Mice as Humanized Mouse Models of Disease and Immunity, J. Clin. Invest. 101:921-26; Bakker *et al.* (2006), A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC, Nature Genetics 38:1166-72 and Supplementary Information; y el International MHC and Autoimmunity Genetics Network (2009) Mapping of multiple

susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:18680-85. Por lo tanto, los polipéptidos del MHC I y/o II humanos o humanizados pueden derivar de una molécula de HLA humano conocida por estar asociada a una enfermedad particular, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias.

- 5 En un aspecto específico, el polipéptido del MHC I humano o humanizado deriva de HLA-A humano. En una realización específica, el polipéptido de HLA-A es un polipéptido de HLA-A2 (por ejemplo, polipéptido de HLA-A2.1). En una realización, el polipéptido de HLA-A es un polipéptido codificado por un alelo HLA-A\*0201, por ejemplo, alelo HLA-A\*02:01:01:01. El alelo HLA-A\*0201 se usa habitualmente entre la población norteamericana. Aunque los presentes Ejemplos describen esta secuencia de HLA particular, cualquier secuencia de HLA-A adecuada queda incluida en el presente documento, por ejemplo, variantes polimórficas de HLA-A2 mostrada en población humana, secuencias con una o más modificaciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras, secuencias de ácidos nucleicos que difieren de la secuencia descrita en el presente documento debido a la degeneración del código genético, etc.

- 15 En otro aspecto específico, la porción humana del polipéptido del MHC I quimérico deriva del MHC I humano seleccionado de HLA-B y HLA-C. En un aspecto, deriva de HLA-B, por ejemplo, HLA-B27. En otro aspecto, deriva de HLA-A3, -B7, -Cw6, etc.

- 20 En un aspecto específico, las porciones humanas de los polipéptidos del MHC II  $\alpha$  y  $\beta$  descritas en el presente documento derivan de HLA-DR humano, por ejemplo, HLA-DR2. Normalmente, las cadenas HLA-DR  $\alpha$  son monomórficas, por ejemplo, la cadena  $\alpha$  del complejo HLA-DR está codificada por un gen de HLA-DRA (por ejemplo, gen HLA-DRA\*01). Por otro lado, la cadena HLA-DR  $\beta$  es polimórfica. Por lo tanto, HLA-DR2 comprende una cadena  $\alpha$  codificada por un gen de HLA-DRA y una cadena  $\beta$  codificada por el gen HLA-DR1 $\beta$ \*1501. Aunque los presentes Ejemplos describen estas secuencias de HLA particulares; cualquier secuencia de HLA-DR adecuada queda incluido en el presente documento, por ejemplo, variantes polimórficas mostradas en población humana, secuencias con una o más modificaciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras, secuencias de ácidos nucleicos que difieren de las secuencias descritas en el presente documento debido a la degeneración del código genético, etc.

- 30 Las porciones humanas del polipéptido del MHC II  $\alpha$  y/o  $\beta$  quimérico pueden estar codificadas por secuencias de ácidos nucleicos de alelos de HLA conocidos por estar asociados a enfermedades humanas comunes. Dichos alelos de HLA incluyen, pero sin limitación, HLA-DRB1\*0401, -DRB1\*0301, -DQA1\*0501, -DQB1\*0201, DRB1\*1501, -DRB1\*1502, -DQB1\*0602, -DQA1\*0102, -DQA1\*0201, -DQB1\*0202, -DQA1\*0501 y combinaciones de los mismos. Para obtener un sumario de las asociaciones entre alelos de HLA y enfermedades, véase Bakker *et al.* (2006), citado anteriormente.

- 35 La porción de roedor de un polipéptido o polipéptidos del MHC I, MHC II  $\alpha$  y/o MHC II  $\beta$  quiméricos humanos/de roedor comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido o polipéptidos del MHC I, MHC II  $\alpha$  y/o MHC II  $\beta$  endógenos de roedor, por ejemplo, de ratón, rata, etc.), respectivamente. Por lo tanto, la porción de roedor del polipéptido del MHC I quimérico humano/de roedor puede comprender dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del MHC I de roedor endógeno. La porción de roedor de un polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico puede comprender dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del MHC II  $\alpha$  de roedor endógeno. La porción de roedor de un polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico humano/de roedor puede comprender dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del MHC II  $\beta$  de roedor endógeno. En un aspecto, el animal no humano es un ratón y una porción de roedor del polipéptido del MHC I quimérico deriva de una proteína H-2K de ratón. En un aspecto, el animal es un ratón y las porciones de roedor de los polipéptidos del MHC II  $\alpha$  y  $\beta$  quiméricos derivan de una proteína H-2E de ratón. Por lo tanto, una porción de roedor del polipéptido del MHC I quimérico puede comprender dominios transmembrana y citoplasmáticos derivados de una H-2K de ratón y porciones de roedor de los polipéptidos del MHC II  $\alpha$  y  $\beta$  quiméricos pueden comprender dominios transmembrana y citoplasmáticos derivados de una proteína H-2E de ratón. Aunque se contemplan secuencias de H-2K y H-2E específicas en los Ejemplos, cualquier secuencia adecuada, por ejemplo, variantes polimórficas, sustituciones de aminoácidos conservadoras/no conservadoras, etc., se incluyen en el presente documento. En un aspecto, el animal no humano es un ratón, y el ratón no expresa polipéptidos del MHC endógenos funcionales de su locus H-2D. En algunas realizaciones, el ratón está modificado por ingeniería genética para carecer total o parcialmente de un locus H-2D endógeno. En otros aspectos, el ratón no expresa ningún MHC I y MHC II de ratón endógeno funcional en una superficie celular.

- 55 Un polipéptido quimérico humano/no humano puede ser de manera que comprende la secuencia líder (señal) humana o no humana. El polipéptido del MHC I quimérico puede comprender una secuencia líder no humana de un polipéptido del MHC I endógeno. El polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico puede comprender una secuencia líder no humana de un polipéptido del MHC II  $\alpha$  endógeno. El polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico puede comprender una secuencia líder no humana de un polipéptido del MHC II  $\beta$  endógeno. El polipéptido del MHC I, MHC II  $\alpha$  y/o MHC II  $\beta$  quimérico comprende una secuencia líder no humana del polipéptido o polipéptidos del MHC I, MHC II  $\alpha$  y/o y MHC II  $\beta$ , respectivamente, de otro animal no humano, por ejemplo, otro roedor u otra cepa de ratón. Por lo tanto, la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido del MHC I, MHC II  $\alpha$  y/o MHC II  $\beta$  quimérico puede estar unido operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder del MHC I, MHC II  $\alpha$  y/o y MHC II  $\beta$  no humano, respectivamente. El polipéptido del MHC I, MHC II  $\alpha$  y/o MHC II  $\beta$  quimérico puede comprender una secuencia líder no humana del polipéptido o polipéptidos del MHC I humano, MHC II  $\alpha$  humano y/o MHC II  $\beta$  humano, respectivamente (por ejemplo, una secuencia líder de HLA-A2 humano, HLA-DRA humano y/o HLA-DR $\beta$ 1\*1501



humano, respectivamente).

Un polipéptido del MHC I, MHC II  $\alpha$  y/o MHC II  $\beta$  quimérico humano/no humano puede comprender en su porción humana un dominio extracelular completo o sustancialmente completo de un polipéptido del MHC I humano, MHC II  $\alpha$  humano y/o MHC II  $\beta$  humano, respectivamente. Por lo tanto, una porción humana puede comprender al menos el 80 %, preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos el 90 %, por ejemplo, el 95 % o más los aminoácidos que codifican un dominio extracelular de un polipéptido del MHC I humano, MHC II  $\alpha$  humano y/o MHC II  $\beta$  (por ejemplo, HLA-A2 humano, HLA-DR $\alpha$  humano y/o HLA-DR $\beta$ 1\*1501 humano). En un ejemplo, el dominio extracelular sustancialmente completo del polipéptido del MHC I humano, MHC II  $\alpha$  humano y/o MHC II  $\beta$  carece de una secuencia líder humana. En otro ejemplo, el polipéptido del MHC I quimérico humano/no humano, el MHC II  $\alpha$  quimérico humano/no humano y/o el MHC II  $\beta$  quimérico humano/no humano comprende una secuencia líder humana.

Asimismo, el polipéptido del MHC I, MHC II  $\alpha$  y/o MHC II  $\beta$  quimérico puede estar unido operativamente a (por ejemplo, expresarse con el control regulador de) elementos promotores y reguladores no humanos endógenos, por ejemplo, elementos reguladores de MHC I, MHC II  $\alpha$  y/o MHC II  $\beta$  de ratón, respectivamente. Dicho ordenamiento facilitará la expresión adecuada de los polipéptidos del MHC I y/o MHC II quiméricos en el animal no humano, por ejemplo, durante la respuesta inmunitaria en el animal no humano.

El roedor de la divulgación, por ejemplo, un ratón, comprende (por ejemplo, en un locus de  $\beta$ 2 microglobulina endógeno) una secuencia de ácido nucleico que codifica una  $\beta$ 2 microglobulina humana o humanizada. La  $\beta$ 2 microglobulina o la cadena ligera del complejo MHC de clase I (también abreviado como " $\beta$ 2M") es una proteína no glucosilada pequeña (12 kDa), que actúa principalmente para estabilizar la cadena MHC I  $\alpha$ . La generación de animales de  $\beta$ 2 microglobulina humana o humanizada se describe en la publicación de patente de los EE.UU n.º 20130111617.

La secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la  $\beta$ 2 microglobulina humano o humanizado puede comprender restos de ácidos nucleicos correspondientes a todo el gen de la  $\beta$ 2 microglobulina humano. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos puede comprender restos de ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 21-119 de una proteína  $\beta$ 2 microglobulina humana (es decir, restos de aminoácidos correspondientes a la  $\beta$ 2 microglobulina humana madura). En una realización alternativa, la secuencia de nucleótidos puede comprender restos de ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 23-115 de una proteína  $\beta$ 2 microglobulina humana, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 23-119 de una proteína  $\beta$ 2 microglobulina humana. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de la  $\beta$ 2 microglobulina humana se describen en Gussow *et al.*, citado anteriormente.

Por lo tanto, el polipéptido de la  $\beta$ 2 microglobulina humano o humanizado puede comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 23-115 de un polipéptido de la  $\beta$ 2 microglobulina humana, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 23-119 de un polipéptido de la  $\beta$ 2 microglobulina humana, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 21-119 de un polipéptido de la  $\beta$ 2 microglobulina humana. Como alternativa, la  $\beta$ 2 microglobulina humana puede comprender los aminoácidos 1-119 de un polipéptido de la  $\beta$ 2 microglobulina humana.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica la  $\beta$ 2 microglobulina humana o humanizada comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en el exón 2 al exón 4 de un gen de la  $\beta$ 2 microglobulina humano. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos comprende secuencias de nucleótidos expuestas en los exones 2, 3 y 4 de un gen de la  $\beta$ 2 microglobulina humano. En esta realización, las secuencias de nucleótidos establecidas en los exones 2, 3 y 4 están unida operativamente para permitir la transcripción y traducción normales del gen. Por lo tanto, en una realización, la secuencia humana comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente del exón 2 al exón 4 de un gen de la  $\beta$ 2 microglobulina humano. En una realización específica, la secuencia humana comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente del exón 2 a aproximadamente 267 pb después del exón 4 de un gen de la  $\beta$ 2 microglobulina humano. En una realización específica, la secuencia humana comprende aproximadamente 2,8 kb de un gen de la  $\beta$ 2 microglobulina humano.

Por lo tanto, el polipéptido de la  $\beta$ 2 microglobulina humano o humanizado puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en el exón 2 al exón 4 de una  $\beta$ 2 microglobulina humana, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos correspondiente del exón 2 al exón 4 de un gen de la  $\beta$ 2 microglobulina humano. Como alternativa, el polipéptido puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende las secuencias de nucleótidos expuestas en los exones 2, 3 y 4 de un gen de la  $\beta$ 2 microglobulina humano. En una realización específica, el polipéptido de la  $\beta$ 2 microglobulina humano o humanizado está codificado por una secuencia de nucleótidos correspondiente del exón 2 a aproximadamente 267 pb después del exón 4 de un gen de la  $\beta$ 2 microglobulina humano. En otra realización específica, el polipéptido humano o humanizado está codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende aproximadamente 2,8 kb de un gen de la  $\beta$ 2 microglobulina humano. Como el exón 4 del gen de la  $\beta$ 2 microglobulina contiene la región sin traducir 5', el polipéptido humano o humanizado puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende los exones 2 y 3 del gen de la  $\beta$ 2 microglobulina.

Los expertos en la materia entenderán que, aunque en el presente documento se describen secuencias específicas de ácido nucleico y aminoácidos para generar animales modificados por ingeniería genéticas, también se desvelan secuencias de una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras, o secuencias diferentes de las descritas en el presente documento debido a la degeneración del código genético.

Por lo tanto, se proporciona un animal no humano que expresa una secuencia de la  $\beta 2$  microglobulina humana, en donde la secuencia de la  $\beta 2$  microglobulina es al menos aproximadamente el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a la secuencia de la  $\beta 2$  microglobulina humana. En una realización específica, la secuencia de la  $\beta 2$  microglobulina es al menos aproximadamente el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a la secuencia de la  $\beta 2$  microglobulina humana descrita en el presente documento. En una realización, la secuencia de la  $\beta 2$  microglobulina humana comprende una o más sustituciones conservadoras. En una realización, la secuencia de la  $\beta 2$  microglobulina humana comprende una o más sustituciones no conservadoras.

Además, se proporcionan roedores en donde la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína  $\beta 2$  microglobulina humana o humanizada también comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en el exón 1 de un gen de la  $\beta 2$  microglobulina de roedor. Por lo tanto, en una realización específica, el roedor comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica una  $\beta 2$  microglobulina humana o humanizada en donde la secuencia de nucleótidos comprende el exón 1 de una  $\beta 2$  microglobulina no humana y los exones 2, 3 y 4 de un gen de la  $\beta 2$  microglobulina humano. Por lo tanto, el polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina humano o humanizado está codificado por el exón 1 de un gen de la  $\beta 2$  microglobulina no humano y los exones 2, 3 y 4 de un gen de la  $\beta 2$  microglobulina humano (por ejemplo, los exones 2 y 3 de un gen de la  $\beta 2$  microglobulina humano).

El roedor (por ejemplo, ratón) de la divulgación, además de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína CD8 quimérica, comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína MHC I humana o humanizada, de manera que la proteína CD8 quimérica expresada en la superficie de un linfocito T del animal sea capaz de asociarse, unirse y/o interactuar con un MHC I humano o humanizado expresado en una superficie de una segunda célula, por ejemplo, una célula presentadora de antígenos. La proteína MHC I comprende un dominio extracelular de un polipéptido del MHC I humano. El roedor expresa además un polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina humano o humanizado. En las publicaciones de patente de los EE.UU. n.º 20130111617 y 20130185819 se describen animales modificados genéticamente de ejemplo que expresan un polipéptido del MHC I y/o un polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina humanos o humanizados. Por lo tanto, en una realización, el animal que comprende la proteína CD8 quimérica descrita en el presente documento puede comprender además un complejo MHC I humanizado, en donde el complejo MHC I humanizado comprende: (1) un polipéptido del MHC I humanizado, por ejemplo, en donde el polipéptido del MHC I humanizado comprende un dominio extracelular de MHC I humano y dominios transmembrana y citoplasmáticos de un MHC I endógeno (por ejemplo, de ratón), por ejemplo, en donde el MHC I humanizado comprende los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de un polipéptido del MHC I humano, y (2) un polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina humano o humanizado (por ejemplo, el animal comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos expuesta en los exones 2, 3 y 4 de una  $\beta 2$  microglobulina humana). En un aspecto, tanto los polipéptidos del MHC I humanizados como los de la  $\beta 2$  microglobulina humanos o humanizados están codificados por secuencias de nucleótidos ubicadas en los loci del MHC I y de la  $\beta 2$  microglobulina endógenos, respectivamente; en un aspecto, el animal no expresa polipéptidos del MHC I y de la  $\beta 2$  microglobulina endógenos funcionales. Por lo tanto, el MHC I expresado por los animales puede ser un polipéptido del MHC I quimérico humano/de roedor (por ejemplo, humano/de ratón). Una porción humana del polipéptido del MHC I quimérico puede derivar de una proteína HLA de clase I humana seleccionada del grupo que consiste en HLA-A, HLA-B y HLA-C, por ejemplo, HLA-A2, HLA-B27, HLA-B7, HLA-Cw6 o cualquier otra molécula de HLA de clase I expresada en una población humana. En la realización, en donde el animal es un ratón, una porción de roedor (es decir, un ratón) del polipéptido del MHC I quimérico puede derivar de una proteína MHC I de ratón seleccionada de H-2D, H-2K y H-2L.

En una realización, el roedor (por ejemplo, ratón) comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína MHC II humana o humanizada, de manera que la proteína CD4 quimérica expresada en la superficie de un linfocito T del animal es capaz de interactuar con un MHC II humano o humanizado expresado en una superficie de una segunda célula, por ejemplo, una célula presentadora de antígenos. La proteína MHC II comprende un dominio extracelular de un polipéptido del MHC II  $\alpha$  humano y un dominio extracelular de un polipéptido del MHC II  $\beta$  humano. Se describen ejemplos de animales modificados genéticamente que expresan un polipéptido del MHC II humano o humanizado en la patente de los EE.UU. n.º 8.847.005, publicada el 30 de septiembre de 2014 y la publicación de patente de los EE.UU. n.º 20130185820. Por lo tanto, en una realización, el animal que comprende la proteína CD4 quimérica descrita en el presente documento puede comprender además una proteína MHC II humanizada, en donde la proteína MHC II humanizada comprende: (1) un polipéptido del MHC II  $\alpha$  humanizado que comprende un dominio extracelular del MHC II  $\alpha$  humano y dominios transmembrana y citoplasmáticos de un MHC II endógeno, por ejemplo, de ratón, en donde el dominio extracelular del MHC II  $\alpha$  humano comprende los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de un MHC II  $\alpha$  humano y (2) un polipéptido del MHC II  $\beta$  humanizado que comprende un dominio extracelular del MHC II  $\beta$  humano y dominios transmembrana y citoplasmáticos de un MHC II endógeno, por ejemplo, de ratón, en donde el dominio extracelular del MHC II  $\beta$  humano comprende los dominios  $\beta 1$  y  $\beta 2$  de un MHC II  $\beta$  humano. En un aspecto, ambos polipéptidos del MHC II  $\alpha$  y  $\beta$  humanizados están codificados por secuencias de ácido nucleico ubicadas en los loci del MHC II  $\alpha$  y  $\beta$  endógenos, respectivamente; en un aspecto, el animal no expresa polipéptidos del MHC II  $\alpha$  y  $\beta$  endógenos funcionales. Por lo tanto, el MHC II expresado por los animales puede ser una proteína MHC II humana/de

roedor (por ejemplo, humana/de ratón). Una porción humana de la proteína MHC II quimérica puede derivar de una proteína HLA de clase II humana seleccionada del grupo que consiste en HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP, por ejemplo, HLA-DR4, HLA-DR2, HLA-DQ2.5, HLA-DQ8, o cualquier otra molécula de HLA de clase II presente en una población humana. En la realización, en donde el animal es un ratón, una porción de roedor (es decir, un ratón) del polipéptido del MHC II quimérico puede derivar de una proteína MHC II de ratón seleccionada de H-2E y H-2A.

Diversos otros ejemplos de un animal no humano modificado genéticamente, por ejemplo un roedor, por ejemplo, rata o ratón, resultarían evidentes para un experto en la materia a partir de la presente divulgación y a partir de la divulgación de la publicaciones de patente de los EE.UU. n.º 20130111617, 20130185819 y 20130185820, y la patente de los EE.UU. n.º 8.847.005.

En diversas realizaciones, los roedores modificados genéticamente descritos en el presente documento producen células, por ejemplo, APC, con MHC I y II humanos o humanizados sobre la superficie celular y, como resultado, presentan péptidos como epítomos para linfocitos T de una manera análoga a la humana, ya que, sustancialmente, todos los componentes del complejo son humanos o humanizados. Los roedores modificados genéticamente de la invención pueden usarse para estudiar la función del sistema inmunitario humano en el animal humanizado; para la identificación de antígenos y epítomos antigénicos que desencadenan la respuesta inmunitaria (por ejemplo, epítomos de linfocitos T, por ejemplo, epítomos únicos de cáncer humano), por ejemplo, para su uso en el desarrollo de vacunas; para la evaluación de candidatos de vacunas y otras estrategias de vacunas; para estudiar la autoinmunidad humana; para estudiar las enfermedades infecciosas humanas; y de otra forma, para idear mejores estrategias terapéuticas basadas en la expresión del MHC humano.

#### **Animales no humanos, Tejidos y células**

El roedor modificado genéticamente de la invención puede seleccionarse de un grupo que consiste en un ratón y una rata. Para los animales no humanos cuyas células ES modificables genéticamente adecuadas no estén fácilmente disponibles, se emplean otros métodos para producir un animal no humano que comprenda la modificación genética. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, modificar el genoma de una célula no ES (por ejemplo, un fibroblasto o una célula pluripotente inducida) y emplear la transferencia nuclear para transferir el genoma modificado a una célula adecuada, por ejemplo, un oocito, y gestar la célula modificada (por ejemplo, el oocito modificado) en un animal no humano en las condiciones adecuadas para formar un embrión.

El animal modificado genéticamente es un roedor. En una realización, el roedor se selecciona de un ratón, una rata y un hámster. En una realización, el roedor se selecciona de la superfamilia *Muroidea*. En una realización, el animal modificado genéticamente es de una familia seleccionada de *Calomyscidae* (por ejemplo, hámsteres similares a ratones), *Cricetidae* (por ejemplo, hámster, ratas y ratones del nuevo mundo, campañoles), *Muridae* (ratones y ratas verdaderos, jerbos, ratones espinosos, ratas con cresta), *Nesomyidae* (ratones trepadores, ratones de abazón de las rocas, ratas de cola blanca, ratas y ratones de Madagascar), *Platacanthomyidae* (por ejemplo, lirón espinoso), y Spalacidae (por ejemplo, ratas topo, ratas del bambú y zokores). En una realización específica, el roedor modificado genéticamente se selecciona de un ratón o rata verdadero (familia *Muridae*), un jerbo, un ratón espinoso y una rata con cresta. En una realización, el ratón modificado genéticamente es un miembro de la familia *Muridae*. En una realización, el animal es un roedor. En una realización específica, el roedor se selecciona de un ratón y una rata. En una realización, el animal no humano es un ratón.

En una realización específica, el roedor es un ratón de una cepa C57BL seleccionada de C578UA, C57BUAn, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BU6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr y C57BL/Ola. En otra realización, el ratón es una cepa 129 seleccionada del grupo que consiste en una cepa que es 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (por ejemplo, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (véase, por ejemplo, Festing *et al.* (1999) "Revised nomenclature for strain 129 mice", Mammalian Genome 10:836, véase también, Auerbach *et al.* (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines). En una realización, el ratón modificado genéticamente es una mezcla de una cepa 129 mencionada anteriormente y una cepa C57BL/6 mencionada anteriormente. En otra realización específica, el ratón es una mezcla de las cepas 129 mencionadas anteriormente, o una mezcla de las cepas BL/6 mencionadas anteriormente. En una realización específica, la cepa 129 de la mezcla es una cepa 129S6 (129/SvEvTac). En otra realización, el ratón es una cepa BALB, por ejemplo, cepa BALB/c. En otra realización más, el ratón es una mezcla de una cepa BALB y otra cepa mencionada anteriormente. Los animales no humanos que se proporcionan en el presente documento pueden ser un ratón derivado de cualquier combinación de las cepas mencionadas anteriormente.

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

Por lo tanto, en una realización de la divulgación se proporciona un ratón modificado genéticamente, en donde el ratón comprende, por ejemplo, en su genoma, por ejemplo, en su genoma de estirpe germinal, (a) una primera secuencia

de nucleótidos que codifica un primer polipéptido del correceptor de linfocitos T quimérico humano/murino (por ejemplo, CD4), una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un segundo polipéptido del correceptor de linfocitos T quimérico humano/murino (por ejemplo, CD8 $\alpha$ ) y/o una tercera secuencia de nucleótidos que codifica un tercer polipéptido del correceptor de linfocitos T quimérico humano/murino (por ejemplo, CD8 $\beta$ ), en donde una porción murina de cada polipéptido del correceptor quimérico de linfocitos T humano/murino comprende al menos dominios transmembrana y citoplasmáticos de un correceptor de linfocitos T murino, en donde una porción humana de cada polipéptido quimérico comprende una porción extracelular (o parte de la misma, por ejemplo, uno o más dominios extracelulares) de un correceptor de linfocitos T humano, y en donde el ratón expresa el primer segundo y/o tercer polipéptido quimérico del correceptor de linfocitos T; (b) un locus génico variable  $\alpha$  del receptor de linfocitos T (TCR) sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\alpha$  humano y al menos un segmento J $\alpha$  humano, unido operativamente a una secuencia génica constante del TCR $\alpha$  murina y/o un locus génico variable del TCR $\beta$  sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\beta$  humano, al menos un segmento D $\beta$  humano, y al menos un segmento J $\beta$  humano, unido operativamente a una secuencia génica constante del TCR $\beta$  murina; y opcionalmente, (c) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido del MHC quimérico humano/murino (por ejemplo, MHC II  $\alpha$ ), una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido del MHC quimérico humano/murino (por ejemplo, MHC II  $\beta$ ) y/o una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un tercer polipéptido del MHC quimérico humano/murino (por ejemplo, MHC I) y un locus de la  $\beta$ 2 microglobulina que codifica una  $\beta$ 2 microglobulina humana o humanizada, en donde una porción humana de cada polipéptido del MHC quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido del MHC humano que se asocia al primero, segundo y/o tercer polipéptido del correceptor de linfocitos T quimérico (por ejemplo, en donde una porción humana de un complejo MHC II quimérico (por ejemplo, polipéptidos del MHC II  $\alpha$  y  $\beta$  humanizado) se asocia al polipéptido de CD4 quimérico y/o una porción humana del polipéptido del MHC I quimérico (o complejo MHC I, por ejemplo, el MHC Ia humanizado y la  $\beta$ 2 microglobulina humana (o humanizada) se asocian al correceptor de CD8 quimérico (por ejemplo, polipéptidos  $\alpha$  y  $\beta$  CD8 humanizados).

En el presente documento se proporciona un ratón modificado genéticamente que comprende en su genoma, por ejemplo, en su locus de CD4 endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD4 quimérico humano/de ratón, en donde una porción de ratón del polipéptido quimérico comprende al menos dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido de CD4 de ratón, y en donde el ratón expresa un CD4 quimérico humano/de ratón. En una realización, una porción humana del polipéptido quimérico comprende al menos todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de un polipéptido de CD4 humano. En una realización, una porción humana del polipéptido quimérico comprende al menos todo o sustancialmente todo el dominio D1 de una proteína CD4 humana. En una realización, una porción humana del polipéptido quimérico comprende al menos todo o sustancialmente todo de los dominios D1-D2 de una proteína CD4 humana, por ejemplo, al menos todo o sustancialmente todo de los dominios D1-D3 de una proteína CD4 humana, por ejemplo, todo o sustancialmente todo de los dominios D1-D4 de una proteína CD4 humana. Por lo tanto, en una realización, el ratón comprende en el locus de CD4 endógeno una secuencia de nucleótidos que comprende al menos todo o sustancialmente todo de los exones 4, 5 y 6 del gen de CD4 humano, por ejemplo, la secuencia del exón 3 del gen de CD4 humano que codifica una porción del dominio D1 de CD4 humano y los exones 4-6 del gen de CD4 humano. En una realización, el ratón comprende en el locus de CD4 endógeno un CD4 quimérico humano/de ratón que comprende una secuencia de CD4 humana que es responsable de interactuar con el MHC II y/o la porción extracelular de un receptor de linfocitos T. En otra realización, el ratón comprende en el locus de CD4 endógeno un CD4 quimérico humano/de ratón que comprende una secuencia de CD4 humana que es responsable de interactuar con el MHC II y/o el dominio variable de un receptor de linfocitos T. En una realización, la secuencia de nucleótidos comprende la secuencia que codifica el péptido señal CD4 de ratón. En una realización, el ratón comprende el reemplazo de la secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de CD4 de ratón con una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de CD4 humano. En otra realización, el ratón comprende el reemplazo de la secuencia de nucleótidos que codifica al menos todo o sustancialmente todo el dominio CD4 D1 de ratón, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica al menos todo o sustancialmente todo de los dominios CD4 D1-D2 de ratón, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica al menos todo o sustancialmente todo de los dominios CD4 D1-D3 de ratón, con una secuencia de nucleótidos humana que codifica los mismos. En una realización, los dominios del polipéptido de CD4 quimérico están codificados por una secuencia de nucleótidos que se representa esquemáticamente en la **FIG. 5A**.

En una realización, el ratón no expresa un DC4 de ratón endógeno funcional a partir de su locus de CD4 de ratón endógeno. En una realización, el ratón en el presente documento comprende la secuencia de nucleótidos de CD4 quimérico humano/de ratón en la estirpe germinal del ratón.

En una realización, el ratón conserva cualquier secuencia endógena que no se haya humanizado, por ejemplo, en la realización en donde el ratón comprende un reemplazo de la secuencia de nucleótidos que codifica todo o sustancialmente todo de los dominios D1-D3, el ratón conserva una secuencia de nucleótidos endógena que codifica el dominio de CD4 D4 de ratón, así como una secuencia de nucleótidos que codifica los dominios transmembrana y citoplasmáticos de CD4 de ratón.

En un aspecto, el ratón que expresa la proteína CD4 quimérica humana/de ratón retiene las secuencias reguladoras y promotoras de CD4 de ratón, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos en el ratón que codifica el CD4 quimérico humano/de ratón está unida operativamente a las secuencias promotoras y reguladoras de CD4 de ratón endógenas.

En un aspecto, estas secuencias reguladoras de ratón retenidas en el animal modificado por ingeniería genética de la invención incluyen las secuencias que regulan la expresión de la proteína quimérica en fases adecuadas durante el desarrollo de los linfocitos T. Por lo tanto, en un aspecto, el ratón no expresa CD4 quimérico en linfocitos B ni en linfocitos T CD8<sup>+</sup> maduros. En un aspecto, el ratón tampoco expresa CD4 quimérico en ningún tipo de célula, por ejemplo, ningún tipo de célula inmunitaria, que normalmente no expresa CD4 endógeno.

Un ratón modificado genéticamente desvelado en el presente documento puede comprender en su genoma, por ejemplo, en su locus de CD8 endógeno, una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8α quimérico humano/de ratón y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8β quimérico humano/de ratón. En una realización, la primera secuencia de nucleótidos comprende una secuencia que codifica todo o sustancialmente todo de una porción extracelular de un polipéptido de CD8α humano y al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido de CD8α de ratón, y la segunda secuencia de nucleótidos comprende una secuencia que codifica todo o sustancialmente todo de una porción extracelular de un polipéptido de CD8β humano y al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido de CD8β de ratón, y en donde el ratón expresa una proteína CD8 quimérica humana/de ratón funcional. En una realización, la primera secuencia de nucleótidos comprende una secuencia que codifica al menos el dominio similar a inmunoglobulina V del polipéptido de CD8α humano y las secuencias restantes de un polipéptido de CD8α de ratón, y la segunda secuencia de nucleótidos comprende una secuencia que codifica al menos el dominio similar a inmunoglobulina V del polipéptido de CD8β humano y las secuencias restantes de un polipéptido de CD8β de ratón. En una realización, la primera secuencia de nucleótidos comprende al menos el dominio de unión a MHC I de un polipéptido de CD8α humano. En una realización, las secuencias de nucleótidos primera y segunda comprenden al menos los exones que codifican la porción extracelular de un polipéptido de CD8α y/o un polipéptido de CD8β humano, respectivamente. En una realización, la porción extracelular de un polipéptido de CD8α y/o polipéptido de CD8β humano es una región que abarca la porción del polipéptido de CD8α y/o polipéptido de CD8β humano que no es un dominio transmembrana o citoplasmático. En una realización, los dominios del polipéptido de CD8α quimérico están codificados por una secuencia de nucleótidos que se representa esquemáticamente en la **FIG. 5B**. En una realización, los dominios del polipéptido de CD8β quimérico están codificados por una secuencia de nucleótidos que se representa esquemáticamente en la **FIG. 5B**. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de CD8α quimérico humano/de ratón y/o el polipéptido de CD8β comprende la secuencia que codifica un péptido señal de CD8α y/o CD8β de ratón, respectivamente. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos puede comprender la secuencia que codifica una secuencia señal de CD8α y/o CD8β humanos. En una realización, el ratón comprende el reemplazo de una secuencia de nucleótidos que codifica todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de CD8α y/o CD8β de ratón con una secuencia de nucleótidos que codifica todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de CD8α y/o CD8β humano, respectivamente.

En una realización, el ratón no expresa un polipéptido de CD8α y/o CD8β de ratón endógeno funcional a partir de su locus de CD8 endógeno. En una realización, el ratón como se describe en el presente documento comprende la secuencia de CD8 quimérica humana/ratón en su estirpe germinal.

En un aspecto, el ratón que expresa el polipéptido de CD8α y/o CD8β quimérico humano/de ratón retiene las secuencias promotoras y reguladoras de CD8α y/o CD8β de ratón, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos en el ratón que codifica el CD8 quimérico humano/de ratón está unida operativamente a las secuencias promotoras y reguladoras de CD8 de ratón endógenas. En un aspecto, estas secuencias reguladoras retenidas en el ratón incluyen las secuencias que regulan la expresión de la proteína CD8 en las fases adecuadas del desarrollo de los linfocitos T. En un aspecto, el ratón modificado genéticamente no expresa CD8 quimérico en linfocitos B ni linfocitos T CD4<sup>+</sup> maduros, o ninguna célula, por ejemplo, célula inmunitaria, que normalmente no expresa CD8 endógeno.

En el presente documento también se desvela un ratón modificado genéticamente que comprende en su genoma un locus génico variable del TCR humano o humanizado sin reordenar, por ejemplo, el locus génico variable del TCRα, TCRβ, TCRδ y/o TCRγ. En algunas realizaciones, el locus génico variable del TCR humano o humanizado sin reordenar reemplaza el locus génico variable del TCR de ratón endógeno. En otras realizaciones, el locus génico variable del TCR humano o humanizado sin reordenar está en un sitio en el genoma distinto del locus del TCR de ratón endógeno correspondiente. En algunas realizaciones, el locus génico variable del TCR sin reordenar humano o humanizado está unido operativamente a la región constante del TCR de ratón.

El ratón comprende en su genoma un locus génico variable de un receptor de linfocitos T sin reordenar (TCR) que comprende al menos un segmento Vα humano y al menos un segmento Jα humano, unido operativamente a una secuencia del gen constante del TCRα de ratón, y un locus génico variable del TCRβ sin reordenar que comprende al menos un segmento Vβ humano, al menos un segmento Dβ humano, y al menos un segmento Jβ humano, unido operativamente a una secuencia del gen constante TCRβ de ratón. En una realización específica, el ratón comprende en su genoma un locus génico variable del TCRα sin reordenar que comprende un repertorio completo de segmentos Vα humanos y un repertorio completo de segmentos Jα humanos unidos operativamente a una secuencia génica constante del TCRα de ratón, y un locus génico variable del TCRβ sin reordenar que comprende un repertorio completo de segmentos Vβ humanos, un repertorio completo de segmentos Dβ humanos, y un repertorio completo de segmentos Jβ humanos unidos operativamente a una secuencia génica constante del TCRβ de ratón.

En algunas realizaciones, el locus génico variable del TCR $\alpha$  sin reordenar que comprende segmentos de la región variable del TCR $\alpha$  humano reemplaza el locus génico variable del TCR $\alpha$  endógeno de ratón, y el locus génico variable del TCR $\beta$  sin reordenar que comprende segmentos de la región variable del TCR $\beta$  humano reemplaza el locus génico variable del TCR $\beta$  endógeno de ratón. En algunas realizaciones, los segmentos V $\alpha$  y J $\alpha$  de ratón endógenos son incapaces de reordenarse para formar una secuencia V $\alpha$ /J $\alpha$  reordenada, y los segmentos V $\beta$ , D $\beta$  y J $\beta$  de roedor endógenos son incapaces de reordenarse para formar una secuencia V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$  reordenada. En algunas realizaciones, los segmentos V $\alpha$  y J $\alpha$  humanos se reordenan para formar una secuencia V $\alpha$ /J $\alpha$  humana reordenada, y los segmentos V $\beta$ , D $\beta$ , y J $\beta$  humanos se reordenan para formar una secuencia V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$  humana reordenada.

La divulgación también se refiere a un ratón modificado genéticamente que comprende en su genoma una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC quimérico, en donde la porción humana del polipéptido del MHC quimérico se asocia a un dominio extracelular humano de un correceptor de linfocitos T quimérico como se desvela en el presente documento. Los ratones modificados por ingeniería genética que se desvelan en el presente documento pueden comprender una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un MHC I quimérico humano/de ratón, una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un MHC II  $\alpha$  quimérico humano/de ratón y/o una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico humano/de ratón. Una porción humana del MHC I, MHC II  $\alpha$  y MHC II  $\beta$  quimérico puede comprender un dominio extracelular de un MHC I, MHC II  $\alpha$  y MHC II  $\beta$  humano, respectivamente. En una realización, el ratón expresa polipéptidos del MHC I, MHC II  $\alpha$  y MHC II  $\beta$  quiméricos humanos/no humanos funcionales a partir de su locus de MHC de ratón endógeno. En una realización, el ratón no expresa polipéptidos del MHC de ratón funcionales, por ejemplo, polipéptidos del MHC I, MHC II  $\alpha$  y MHC II  $\beta$  de ratón funcionales, a partir de su locus del MHC de ratón endógeno. En otras realizaciones, los únicos MHC I y MHC II expresados por el ratón en una superficie celular son los MHC I y II quiméricos.

Una porción humana del polipéptido del MHC I humano/de ratón quimérico comprende un dominio de unión a péptidos o un dominio extracelular de un MHC I humano (por ejemplo, HLA-A humano, por ejemplo, HLA-A2 humano, por ejemplo, HLA-A2.1 humano). En algunas realizaciones, el ratón no expresa un dominio de unión a péptidos o extracelular de un polipéptido del MHC I de ratón endógeno a partir de su locus del MHC de ratón endógeno. El dominio de unión a péptidos del MHC I humano puede comprender dominios  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2. Como alternativa, el dominio de unión a péptidos del MHC I humano puede comprender dominios  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3. En un aspecto, el dominio extracelular del MHC I humano comprende un dominio extracelular de una cadena  $\alpha$  del MHC I humano. En una realización, el locus del MHC I de ratón endógeno es un locus de H-2K (por ejemplo, H-2Kb) y la porción de ratón del polipéptido del MHC I quimérico comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido de H-2K (por ejemplo, H-2Kb) de ratón. Por lo tanto, en una realización, el ratón comprende en su locus del MHC I de ratón endógeno una secuencia de ácido nucleico que codifica un MHC I quimérico humano/de ratón, en donde una porción humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido de HLA-A2 (por ejemplo, HLA-A2.1) humano y una porción de ratón comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido de H-2K (por ejemplo, H-2Kb) de ratón, y un ratón expresa una proteína HLA-A2/H-2K humana/de ratón. En otra realización, la porción de ratón del polipéptido del MHC I quimérico puede derivar de otro MHC I de ratón, por ejemplo, H-2D, H-2L, etc.; y la porción humana del polipéptido del MHC I quimérico puede derivar de otro MHC I humano, por ejemplo, HLA-B, HLA-C, etc. En un aspecto, el ratón no expresa un polipéptido de H-2K endógeno funcional a partir de su locus H-2K de ratón endógeno. En una realización, el ratón no expresa polipéptidos del MHC endógenos funcionales a partir de su locus de H-2D endógeno. En algunas realizaciones, el ratón está modificado por ingeniería genética para carecer total o parcialmente de un locus H-2D endógeno. En otras realizaciones, los únicos polipéptidos del MHC I expresados por el ratón sobre una superficie celular son polipéptidos del MHC I quiméricos humano/de ratón.

En una realización, una porción humana del polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico humanos/de ratón comprende un dominio de unión al péptido del MHC II  $\alpha$  humano o extracelular o una porción del polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico humanos/de ratón comprende un dominio de unión al polipéptido del MHC II  $\beta$  humano o extracelular. En algunas realizaciones, el ratón no expresa un dominio de unión a péptido o extracelular de polipéptido  $\alpha$  y/o  $\beta$  de ratón endógeno a partir de un locus de ratón endógeno (por ejemplo, locus de H-2A y/o H-2E). En algunas realizaciones, el ratón comprende un genoma que carece de un gen que codifica una molécula del MHC de clase II funcional que comprende un H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2, H-2Ea y una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, los únicos polipéptidos del MHC II expresados por el ratón sobre una superficie celular son polipéptidos del MHC II quiméricos de humano/de ratón. El dominio de unión a péptido del polipéptido del MHC II  $\alpha$  humano puede comprender un dominio  $\alpha$ 1 y el dominio de unión a péptido del polipéptido del MHC II  $\beta$  humano puede comprender un dominio  $\beta$ 1; por lo tanto, el dominio de unión a péptido del complejo del MHC II quimérico puede comprender dominios  $\alpha$ 1 y  $\beta$ 1 humanos. El dominio extracelular del polipéptido  $\alpha$  del MHC humano puede comprender dominios  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 y el dominio extracelular del polipéptido del MHC II  $\beta$  humano puede comprender dominios  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2; por lo tanto, el dominio extracelular del complejo del MHC II quimérico puede comprender dominios  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2. En una realización, la porción humana del complejo MHC II quimérico comprende dominios transmembrana y citosólicos de MHC II de ratón, por ejemplo, H-2E (por ejemplo, dominios transmembrana y citosólicos de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de H-2E de ratón). Por lo tanto, en una realización, el ratón de la invención comprende en su locus del MHC I de ratón endógeno una secuencia de ácido nucleico que codifica un MHC II quimérico humano/de ratón, en donde la porción humana del polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico comprende un dominio extracelular derivado de una cadena  $\alpha$  de un MHC II humano (por ejemplos, cadena  $\alpha$  de HLA-DR2) y una porción de ratón comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos derivados de una cadena  $\alpha$  de un MHC II de ratón (por ejemplo, H-2E); y un ratón comprende en su locus del MHC II de ratón

endógeno una secuencia de ácido nucleico que codifica un MHC II  $\beta$  quimérico humano/de ratón, en donde una porción humana del polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico comprende un dominio extracelular derivado de una cadena  $\beta$  de un MHC II humano (por ejemplo, cadena  $\beta$  de HLA-DR2) y una porción de ratón comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos derivados de una cadena  $\beta$  de un MHC II de ratón (por ejemplo, H-2E); por ejemplo, en donde el ratón expresa una proteínas HLA/DR2/H-2E de humano/ratón. En otra realización, la porción de ratón de la proteína MHC II quimérica puede derivar de otro MHC II de ratón, por ejemplo, H-2A, etc.; y la porción humana de la proteína MHC II quimérica puede derivar de otro MHC II humano, por ejemplo, HLA-DQ, etc. En un aspecto, el ratón no expresa los polipéptidos H-2A y H-2E endógenos funcionales a partir de sus loci de ratón endógenos (por ejemplo, el ratón no expresa los polipéptidos H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2 y H-2Ea). En algunas realizaciones, el ratón carece de expresión de cualquier molécula del MHC I o MHC II endógena en la superficie celular.

En diversos aspectos, la  $\beta$ 2 microglobulina humana o humanizada expresada por un animal no humano modificado genéticamente, o células, embriones o tejidos derivados de un animal no humano, conserva todos los aspectos funcionales de la  $\beta$ 2 microglobulina endógena y/o humana. Por ejemplo, se prefiere que la  $\beta$ 2 microglobulina humana o humanizada se una a la cadena  $\alpha$  del polipéptido del MHC I (por ejemplo, polipéptido del MHC I humano o no humano endógeno). El polipéptido de la  $\beta$ 2 microglobulina humano o humanizado puede unirse, reclutarse o asociarse de cualquier otra forma con cualquier otra molécula, por ejemplo, moléculas receptoras, receptoras de anclaje o de señalización que se asocian a  $\beta$ 2 microglobulina no humana endógena y/o humana (por ejemplo, HFE, etc.).

Además de los animales modificados por ingeniería genética (por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratones o ratas), en el presente documento también se desvela un tejido o célula, en donde el tejido o célula deriva de un animal no humano como se describe en el presente documento, y comprende un gen de la  $\beta$ 2 microglobulina heterólogo o una secuencia de la  $\beta$ 2 microglobulina, es decir, la secuencia de nucleótidos o aminoácidos. En un ejemplo, el gen de la  $\beta$ 2 microglobulina heterólogo o de la secuencia de la  $\beta$ 2 microglobulina es un gen de la  $\beta$ 2 microglobulina humano o humanizada o una secuencia de la  $\beta$ 2 microglobulina humana o humanizada. Preferentemente, la célula es una célula nucleada. La célula puede ser cualquier célula conocida por expresar el complejo MHC I, por ejemplo, una célula presentadora de antígenos. El polipéptido de la  $\beta$ 2 microglobulina humano o humanizado expresado por dicha célula puede interactuar con el MHC I no humano endógeno (por ejemplo, MHC I de roedor), para formar un complejo MHC I funcional. El complejo MHC I resultante puede ser capaz de interactuar con un linfocito T, por ejemplo, un linfocito T citotóxico. Por lo tanto, también se desvela en el presente documento un complejo *in vitro* de una célula de un animal no humano como se describe en el presente documento y un linfocito T.

También se desvelan células no humanas que comprenden el gen o secuencia de la  $\beta$ 2 microglobulina humana o humanizada, y una secuencia humana o humanizada adicional, por ejemplo, el polipéptido del MHC I quimérico desvelado actualmente. En un caso de este tipo, el polipéptido de la  $\beta$ 2 microglobulina humano o humanizado puede interactuar con, por ejemplo, un polipéptido del MHC I quimérico humano/no humano y se puede formar un complejo MHC I funcional. En algunos aspectos, dicho complejo es capaz de interactuar con un TCR en un linfocito T, por ejemplo, un linfocito T humano o uno no humano. Por lo tanto, también se desvela un complejo *in vitro* de una célula a partir de un animal no humano como se describe en el presente documento y un linfocito T humano o uno no humano.

Otro aspecto de la divulgación es un embrión de roedor (por ejemplo, un embrión de ratón o de rata) que comprende un gen de la  $\beta$ 2 microglobulina heterólogo o una secuencia de la  $\beta$ 2 microglobulina como se desvela en el presente documento. El embrión puede comprender una célula donante ES que comprende el gen de la  $\beta$ 2 microglobulina o la secuencia de la  $\beta$ 2 microglobulina y células embrionarias hospedadoras. El gen de la  $\beta$ 2 microglobulina heterólogo o la secuencia de la  $\beta$ 2 microglobulina es un gen de la  $\beta$ 2 microglobulina o una secuencia de la  $\beta$ 2 microglobulina humana o humanizada.

En el presente documento se desvela una célula no humana que comprende un cromosoma o fragmento del mismo de un animal no humano como se describe en el presente documento (por ejemplo, en el que el cromosoma o fragmento del mismo comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de  $\beta$ 2 microglobulina humana o humanizada). La célula no humana puede comprender un núcleo de un animal no humano como La célula no humana puede comprender el cromosoma o fragmento del mismo como resultado de una transferencia nuclear.

Se desvela una célula pluripotente inducida no humana que comprende un gen de la  $\beta$ 2 microglobulina o una secuencia de la  $\beta$ 2 microglobulina heteróloga. La célula pluripotente inducida puede derivar de un animal no humano. El gen de la  $\beta$ 2 microglobulina heterólogo o la secuencia de la  $\beta$ 2 microglobulina es un gen o secuencia humanos o humanizados.

En algunas realizaciones, el ratón descrito en el presente documento expresa MHC II quimérico humano/de ratón solo en células presentadoras de antígenos profesionales, por ejemplo, linfocito B, monocitos/macrófagos y/o células dendríticas del ratón. En algunas realizaciones, un ratón descrito en el presente documento provoca una respuesta inmunitaria, por ejemplo, una respuesta inmunitaria celular, a uno o más antígenos humanos. En algunas realizaciones, un ratón descrito en el presente documento provoca una respuesta de linfocitos T humanizados a uno o más antígenos humanos.

Además de un animal no humano modificado por ingeniería genética, un embrión no humano (por ejemplo, un embrión

de roedor, por ejemplo, de ratón o de rata) también se desvela en donde el embrión comprende una célula ES donante que deriva de un animal no humano (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata) como se desvela en el presente documento. El embrión puede comprender una célula ES que donante comprende el gen de CD4 quimérico, el gen de CD8 (por ejemplo, CD8 $\alpha$  y/o CD8 $\beta$ ) quimérico, una secuencia de ácido nucleico del MHC I humanizado (por ejemplo, MHC I  $\alpha$ ), una secuencia de ácido nucleico de MHC II humanizado (por ejemplo, MHC II  $\alpha$  y/o MHC II  $\beta$ ), un locus del TCR humanizado sin reordenar (por ejemplo, TCR $\alpha$  y/o TCR $\beta$ , o TCR $\delta$ , y/o TCR $\gamma$ ) y/o la secuencia del gen de la  $\beta$ 2 microglobulina humano o humanizado y células embrionarias hospedadoras.

También se desvela un tejido, en donde el tejido deriva de un animal no humano (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata) como se desvela en el presente documento, y expresa la proteína CD4 quimérica, la proteína CD8 quimérica (por ejemplo, proteína CD8 $\alpha$  y/o CD8 $\beta$  quimérica), un polipéptido del TCR humanizado (por ejemplo, polipéptido TCR $\alpha$  y/o TCR $\beta$ , o TCR $\delta$  y/o TCR $\gamma$ ), un polipéptido del MHC I humanizado (por ejemplo, MHC I  $\alpha$ ), un polipéptido del MHC II humanizado (por ejemplo, polipéptido del MHC II  $\alpha$  y/o MHC II  $\beta$ ) y/o una  $\beta$ 2 microglobulina humana o humanizada.

Se desvela un método para producir una molécula de CD4 quimérica humana/no humana, que comprende expresar en una única célula una proteína CD4 quimérica de una construcción de nucleótidos como se desvela en el presente documento. La construcción de nucleótidos puede ser un vector vírico; específicamente, el vector vírico puede ser un vector lentivírico. la célula puede seleccionarse entre un CHO, COS, 293, HeLa y una célula retiniana que expresa una secuencia de ácido nucleico vírica (por ejemplo, una célula PERC.6<sup>TM</sup>).

Se desvela una célula que expresa una proteína CD4 quimérico, la célula puede comprender un vector de expresión que comprende una secuencia de CD4 quimérico como se describe en el presente documento. La célula puede seleccionarse de CHO, COS, 293, HeLa y una célula retiniana que expresa una secuencia de ácido nucleico vírica (por ejemplo, una célula PERC.6<sup>TM</sup>).

También se desvela una molécula de CD4 quimérico fabricada por un animal no humano como se desvela en el presente documento en donde, la molécula CD4 quimérica comprende una secuencia de aminoácidos de todo o sustancialmente todo de uno un dominio extracelular de una proteína CD4 humana, y al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos procedentes de una proteína CD4 no humana, por ejemplo, proteína CD4 de ratón. se desvela una molécula de CD4 quimérico elaborada por un animal no humano como se desvela en el presente documento en donde la molécula de CD4 quimérico comprende una secuencia de aminoácidos de al menos todo o sustancialmente todo el dominio D1 de un CD4 humano, por ejemplo, al menos todo o sustancialmente todo de los dominios D1-D2 de un CD4 humano, por ejemplo, al menos todo o sustancialmente todo de los dominios D1-D3 de un CD4 humano, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de CD4 humano que es responsable de unirse al MHC II y/o al dominio extracelular de un TCR, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de CD4 humano que es responsable de unirse a MHC II y/o un dominio variable de un TCR; y en donde el resto de la proteína (por ejemplo, dominio transmembrana, dominio citoplasmático, cualquier porción del dominio extracelular que no se haya humanizado) deriva de la secuencia de proteína endógena no humana. Un polipéptido de CD4 quimérico humano/no humano de ejemplo comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 78, y la porción humana del polipéptido quimérico abarca aproximadamente los aminoácidos 27-319 de la SEQ ID NO: 78 (expuesta por separado en la SEQ ID NO: 79).

Se desvela un método para generar una molécula CD8 quimérica humana/no humana (por ejemplo, CD8 $\alpha$  y/o CD8 $\beta$ ), que comprende expresar en una única célula un polipéptido de CD8 quimérico a partir de una construcción de nucleótidos como se describe en el presente documento. la construcción de nucleótidos puede ser un vector vírico; El vector puede ser un vector lentivírico. La célula puede seleccionarse de CHO, COS, 293, HeLa y una célula retiniana que expresa una secuencia de ácido nucleico vírica (por ejemplo, una célula PERC.6<sup>TM</sup>).

Se desvela una célula que expresa una proteína CD8 quimérica. La célula puede comprender un vector de expresión que comprende una secuencia de CD8 quimérica como se describe en el presente documento. La célula puede seleccionarse de CHO, COS, 293, HeLa y una célula retiniana que expresa una secuencia de ácido nucleico vírica (por ejemplo, una célula PERC.6<sup>TM</sup>).

También se desvela una molécula de CD8 quimérico fabricada por un animal no humano como se describe en el presente documento en donde, en donde la molécula de CD8 quimérica comprende todo o sustancialmente todo del dominio extracelular de una proteína CD8 humana (por ejemplo, CD8 $\alpha$  y/o CD8 $\beta$ ), y al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de una proteína CD8 no humana, por ejemplo, una proteína CD8 de ratón. Un polipéptido de CD8 $\alpha$  quimérico de ejemplo se expone en la SEQ ID NO: 88 y una proteína CD8 $\beta$  quimérica de ejemplo se expone en la SEQ ID NO: 83.

También se desvela una proteína TCR humanizada producida por un animal no humano (por ejemplo, roedor, por ejemplo, ratón o rata) como se describe en el presente documento, en donde la proteína TCR humanizada comprende una región variable humana y una región constante no humana. Por lo tanto, la proteína TCR humanizada comprende regiones determinantes de la complementariedad humanas (es decir, CDR1, 2 y 3 humanas) en su dominio variable y una región constante no humana. También se desvelan ácidos nucleicos que codifican los dominios variables del



TCR humano generados por un animal no humano desvelado en el presente documento.

Además, se desvela una célula no humana aislada de un animal no humano como se describe en el presente documento. La célula puede ser una célula ES. La célula puede ser un linfocito T, por ejemplo, un linfocito T CD4+. La célula puede ser un linfocito T auxiliar (linfocito T<sub>H</sub>). El linfocito T<sub>H</sub> puede ser un linfocito T<sub>H</sub> efector, por ejemplo, linfocito T<sub>H</sub>1 o linfocito T<sub>H</sub>2. La célula puede ser un linfocito T CD8+. La célula puede ser un linfocito T citotóxico. También se desvela una célula no humana que expresa una proteína TCR que comprende una región variable humana y una región constante no humana. La proteína TCR puede comprender TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , o una combinación de los mismos. La célula puede ser un linfocito T, por ejemplo, un linfocito T CD4+ o CD8+. Adicionalmente, los linfocitos T no humanos que se desvelan en el presente documento pueden expresar en su superficie celular (a) un correceptor de linfocitos T quimérico humano/no humano, por ejemplo, un polipéptido de CD4 quimérico o un polipéptido de CD8 quimérico, que comprende un dominio extracelular de correceptor de linfocitos T humano unido operativamente a un dominio transmembrana y/o intracelular de correceptor de linfocitos T no humano; y (b) una proteína TCR que comprende una región variable humana y una región constante no humana.

La célula puede ser una célula presentadora de antígeno. La célula presentadora de antígeno puede presentar antígeno en moléculas del MHC I humanizadas. La célula presentadora de antígeno puede ser una célula presentadora de antígeno profesional, por ejemplo, un linfocito B, una célula dendrítica y un macrófago. La célula presentadora de antígeno puede presentar antígeno en moléculas del MHC I humanizado y/o MHC II humanizado.

Se desvela una célula que expresa proteínas MHC I y MHC II quiméricas humanas/no humanas (por ejemplo, proteínas HLA-A2/H-2K y HLA-DR2/H-2E). La célula puede ser una célula de ratón que no expresa polipéptidos del MHC endógenos funcionales a partir de su locus de H-2D endógeno. En algunas realizaciones, la célula es una célula de ratón diseñada por ingeniería genética para carecer total o parcialmente de un locus de H-2D endógeno. En algunas realizaciones, la célula es una célula de ratón que no expresa ningún polipéptido endógeno funcional de MHC I y MHC II en su superficie. La célula comprende un vector de expresión que comprende una secuencia de MHC de clase I quimérico y una secuencia de MHC de clase II quimérico como se describe en el presente documento. La célula puede seleccionarse de CHO, COS, 293, HeLa y una célula retiniana que expresa una secuencia de ácido nucleico vírica (por ejemplo, una célula PERC.6<sup>TM</sup>).

Un complejo MHC II quimérico que comprende un dominio extracelular de HLA-DR2 desvelado en el presente documento puede detectarse mediante anticuerpo dirigido contra HLA-DR. Por lo tanto, una célula que presenta polipéptido del MHC II humano/no humano puede detectarse y/o seleccionarse usando anticuerpos anti-HLA-DR. El complejo MHC I quimérico que comprende un dominio extracelular de HLA-A2 descrito en el presente documento puede detectarse usando anticuerpos anti-HLA-A, por ejemplo, anti-HLA-A2. Por lo tanto, una célula que presenta un polipéptido del MHC I humano/no humano puede detectarse y/o seleccionarse usando un anticuerpo anti-HLA-A. Los anticuerpos que reconocen otros alelos de HLA están disponibles en el mercado o pueden generarse y pueden usarse para la detección/selección.

Aunque los Ejemplos a continuación describen un animal diseñado por ingeniería genética cuyo genoma comprende un reemplazo de una secuencia de ácido nucleico que codifica las proteínas H-2K, H2-A y H-2E de ratón con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína HLA-A2/H-2K y HLA-DR2/H-2E quimérica humana/de ratón, respectivamente, el experto en la materia entendería que puede usarse una estrategia similar para introducir quimeras que comprenden otros genes del MHC I y MHC II humanos (otros genes de HLA-A, HLA-B y HLA-C; y otros HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ). También se proporcionan dichos animales que comprenden múltiples genes del MHC I y MHC II quiméricos humanos/no humanos (por ejemplo, humano/de roedor, por ejemplo, humano/de ratón) en los loci del MHC endógenos. Se describen ejemplos de dichas proteínas MHC I y MHC II quiméricas se describen en las publicaciones de los EE.UU. N.º 20130111617, 20130185819, 20130185820 y 20140245467 y en la patente de los EE.UU. n.º 8.847.005.

También se desvela una célula no humana que comprende un cromosoma o fragmento del mismo de un animal no humano como se describe en el presente documento. La célula no humana puede comprender un núcleo de un animal no humano como se describe en el presente documento. La célula no humana comprende el cromosoma o fragmento del mismo como resultado de una transferencia nuclear.

En un aspecto, se desvela una célula pluripotente inducida no humana que comprende un gen que codifica un polipéptido de CD4 quimérico, un gen que codifica un polipéptido de CD8 quimérico (por ejemplo, polipéptido de CD8 $\alpha$  y/o CD8 $\beta$ ), un gen que codifica un polipéptido del MHC I humanizado (por ejemplo, MHC I  $\alpha$  y/o  $\beta$ 2 microglobulina), un gen que codifica un polipéptido del MHC II humanizado (por ejemplo, MHC II  $\alpha$  y/o MHC II  $\beta$ ) y/o un locus del TCR humanizado sin reordenar que codifica un polipéptido del TCR $\alpha$  y/o TCR $\beta$  humanizado como se describe en el presente documento. La célula pluripotente inducida puede derivar de un animal no humano como se describe en el presente documento.

Un hibridoma o cuadroma, deriva de una célula de un animal no humano como se describe en el presente documento. El animal no humano puede ser un ratón o rata.

**Animales no humanos modificados genéticamente que generan respuestas inmunitarias de linfocitos T sustancialmente humanizados**

También se desvela un método para generar un animal no humano modificado por ingeniería genética (por ejemplo, un roedor modificado genéticamente, por ejemplo, un ratón o una rata) descrito en el presente documento. Generalmente, los métodos comprenden (a) introducir en el genoma del animal no humano una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del correceptor de linfocitos T quimérico humano/no humano, una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un segundo polipéptido del correceptor de linfocitos T humanos/no humanos quiméricos, y/o una tercera secuencia de nucleótidos que codifica un tercer polipéptido del correceptor de linfocitos T humanos/no humanos quimérico, en donde una porción no humana de cada polipéptido del correceptor de linfocitos T quimérico comprende al menos dominios transmembrana y citoplasmáticos de un correceptor de linfocitos T no humano, y en donde una porción humana de cada polipéptido quimérico comprende una porción extracelular (o parte de la misma) de un correceptor de linfocitos T humano; (b) insertar en el genoma del animal no humano un locus génico variable  $\alpha$  del receptor de linfocitos T (TCR) sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\alpha$  humano y al menos un segmento J $\alpha$  humano, unido operativamente a una secuencia génica constante del TCR $\alpha$  no humano y/o un locus génico variable del TCR $\beta$  sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\beta$  humano, al menos un segmento D $\beta$  humano, y al menos un segmento J $\beta$  humano, unido operativamente a una secuencia génica constante del TCR $\beta$  no humano; y opcionalmente (c) colocar en el genoma una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido del MHC quimérico humano/no humano, una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido del MHC quimérico humano/no humano y/o una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un tercer polipéptido del MHC quimérico humano/no humano y/o (d) añadir al genoma del animal no humano un locus de la  $\beta$ 2 microglobulina que codifica un polipéptido de la  $\beta$ 2 microglobulina humano o humanizado. Las etapas de introducir, insertar y/o colocar pueden comprender secuencias de direccionamiento que codifican el uno o más dominios extracelulares del correceptor de linfocitos T, el dominio o dominios variable del TCR, el dominio o dominios extracelulares del polipéptido del MHC, o una porción de la  $\beta$ 2 microglobulina y reemplazarlas con secuencias que codifican el dominio o dominios extracelulares del correceptor de linfocitos T humano, dominios variables de TCR humanos, uno o más dominios extracelulares del MHC humano y/o una porción humana de la  $\beta$ 2 microglobulina, respectivamente.

Introducir, insertar, colocar y/o añadir puede comprender reproducir, por ejemplo, aparear, animales de la misma especie. Introducir, insertar, colocar y/o añadir puede comprender la recombinación homóloga secuencial en células ES no humanas. Las células ES pueden derivar de animales no humanos modificados por ingeniería genética para comprender uno o más, aunque no todas, las modificaciones genéticas deseadas, y la recombinación homóloga en dichas células ES completa la modificación genética. Introducir, insertar, colocar y/o añadir puede comprender una combinación de reproducción y recombinación homóloga en células ES, por ejemplo, reproducir un animal no humano con otro (o más) animales de la misma especie, en donde algunos o todos los animales pueden generarse a partir de células ES modificadas genéticamente a través de una única recombinación homóloga o eventos de recombinación homóloga secuencial, y en donde algunas células ES pueden aislarse de un animal no humano que comprende una o más de las modificaciones genéticas desveladas en el presente documento.

El método puede utilizar una construcción dirigida fabricada usando la tecnología VELOCIGENE®, introducir la construcción en células ES, e introducir los clones de células ES dirigidos en un embrión de ratón usando la tecnología VELOCIMOUSE®, como se describe en los Ejemplos. La construcción de direccionamiento puede comprender brazos de homología 5' y/o 3' que se dirigen a la secuencia endógena que se va a reemplazar, una secuencia de inserción (que reemplaza la secuencia endógena) y uno o más casetes de selección. Un casete de selección es una secuencia de nucleótidos insertada en una construcción de direccionamiento para facilitar la selección de células (por ejemplo, células ES) que han integrado la construcción de interés. Se conoce en la técnica un número de casetes de selección adecuados. Habitualmente, un casete de selección permite la selección positiva en presencia de un antibiótico particular (por ejemplo, Neo, Hyg, Pur, CM, SPEC, etc.). Además, un casete de selección puede estar flanqueado por sitios de recombinación, que permiten la supresión del casete de selección tras el tratamiento con enzimas recombinasas. Los sitios de recombinación habitualmente utilizados son *loxP* y *Frt*, reconocidos por las enzimas Cre y Flp, respectivamente, pero se conocen otros en la técnica. Un casete de selección puede localizarse en cualquier lugar de la construcción fuera de la región codificante. El casete de selección puede estar ubicado en el extremo 5' del fragmento de ADN humano. El casete de selección puede estar ubicado en el extremo 3' del fragmento de ADN humano. El casete de selección se ubica dentro del fragmento de ADN humano. El casete de selección se ubica dentro de un intrón del fragmento de ADN humano. El casete de selección puede estar situado en la unión del fragmento de ADN humano y de ratón.

El método para generar un animal no humano modificado genéticamente puede dar como resultado que el animal comprenda en un locus de CD4 endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD4 quimérico humano/no humano. La divulgación comprende un método de modificación de un locus de CD4 de un animal no humano para expresar un polipéptido de CD4 quimérico humano/no humano descrito en el presente documento. Se desvela un método de modificación de un locus de CD4 de un ratón para expresar un polipéptido de CD4 quimérico humano/de ratón que comprende introducir, por ejemplo, reemplazar en un locus de CD4 endógeno de un animal no humano, por ejemplo, un ratón, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD4 no humano endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD4 quimérico humano/de ratón. El

polipéptido de CD4 quimérico humano/de ratón puede comprender todo o sustancialmente todo de un dominio extracelular de un polipéptido de CD4 humano y al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido de CD4 endógeno de ratón. El polipéptido de CD4 quimérico humano/de ratón puede comprender todos o sustancialmente de todos de los dominios D1-D2 de un polipéptido de CD4 humano. El polipéptido de CD4 quimérico humano/de ratón puede comprender todos o sustancialmente todos los dominios D1-D3 de un polipéptido de CD4 humano. El polipéptido de CD4 quimérico humano/de ratón puede comprender todo o sustancialmente todo de la secuencia de aminoácidos de CD4 humano que es responsable de interactuar con el MHC II y/o un dominio extracelular de un receptor de linfocitos T. El polipéptido de CD4 quimérico humano/de ratón puede comprender todo o sustancialmente todo de la secuencia de aminoácidos de CD4 humano que es responsable de interactuar con el MHC II y/o un dominio variable de un receptor de linfocitos T.

Por lo tanto, se desvela una construcción de nucleótidos para generar animales modificados por ingeniería genética que comprenden CD4 quimérico humano/no humano. La secuencia de nucleótidos comprende brazos de homología 5' y 3', un fragmento de ADN que comprende la secuencia del gen de CD4 humano (por ejemplo, secuencia del gen del dominio extracelular CD4 humano, por ejemplo, la secuencia génica de todos o sustancialmente de todos los dominios D1-D2 de CD4 humano, por ejemplo, la secuencia génica de todos o sustancialmente de todos los dominios D1-D3 y/o D2-D3 de CD4 humano, por ejemplo, la secuencia génica de todos o sustancialmente de todos los dominios D1-D4 de CD4 humano), y un casete de selección flanqueado por sitios de recombinación. La secuencia del gen de CD4 humano puede ser una secuencia genómica que comprende intrones y exones de CD4 humano. Los brazos de homología son homólogos a la secuencia genómica de CD4 no humana (por ejemplo, de ratón). En la FIG. 5A. se representa una construcción de ejemplo.

El método puede dar como resultado un animal que comprende en un locus de CD8 endógeno una secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido de CD8 $\alpha$  y/o CD8 $\beta$  quimérico humano/no humano. Se desvela un método de modificación de un locus de CD8 de un animal no humano para expresar un polipéptido de CD8 quimérico humano/no humano descrito en el presente documento. Se desvela un método de modificación de un locus de CD8 de un ratón para expresar un polipéptido de CD8 quimérico humano/de ratón que comprende introducir, por ejemplo, reemplazar, en un locus de CD8 endógeno de un animal no humano, por ejemplo, un ratón, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8 no humano endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CD8 quimérico humano/de ratón. El polipéptido de CD8 puede seleccionarse de CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$  y combinaciones de los mismos. El polipéptido quimérico puede comprender todo o sustancialmente todo de un dominio extracelular de un polipéptido de CD8 humano y al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido de CD8 endógeno de ratón.

Por lo tanto, también se desvela una construcción de nucleótidos para generar animales modificados por ingeniería genética que comprenden CD8 humano/no humano. La secuencia de la construcción de nucleótidos puede comprender brazos de homología 5' y 3', un fragmento de ADN que comprende una secuencia de CD8 $\alpha$  o CD8 $\beta$ , y un casete de selección flanqueado por sitios de recombinación. La secuencia humana puede comprender intrones y exones de CD8 $\alpha$  o CD8 $\beta$  humano, por ejemplo, exones que codifican el dominio extracelular del CD8 $\alpha$  o CD8 $\beta$  humano, respectivamente. Los brazos de homología pueden ser homólogos a la secuencia de CD8 $\alpha$  o CD8 $\beta$  no humana. En la FIG. 5B. se representan construcciones de ejemplo para CD8 $\alpha$  y CD8 $\beta$ .

Debido a la estrecha localización cromosómica de los genes que codifican CD8 $\alpha$  y CD8 $\beta$ , la orientación secuencial de los dos genes mejora las posibilidades de una humanización exitosa. La estrategia de direccionamiento puede comprender introducir la construcción de CD8 $\beta$  quimérica descrita en el presente documento en células ES, generar un ratón a partir de las células ES objetivo, derivar células ES modificadas genéticamente de dicho ratón, e introducir la construcción quimérica de CD8 $\alpha$  descrita en el presente documento en dichas células ES modificadas genéticamente. La estrategia de direccionamiento puede comprender introducir una construcción de CD8 $\beta$  quimérica descrita en el presente documento en células ES, seleccionar las células que han incorporado la construcción de CD8 $\beta$  quimérica, introducir una construcción de CD8 $\alpha$  quimérica descrita en el presente documento en células ES que han incorporado y albergan la construcción de CD8 $\beta$  quimérica, y seleccionar las células que han incorporado tanto CD8 $\beta$  como CD8 $\alpha$  quiméricos. Las etapas de selección pueden realizarse utilizando diferentes marcadores de selección. La humanización de CD8 $\alpha$  puede lograrse en primer lugar. Tras completar el direccionamiento del gen, las células ES de animales no humanos modificados genéticamente pueden cribarse para confirmar la incorporación exitosa de una secuencia de nucleótidos exógena de interés o la expresión de un polipéptido exógeno mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, la modificación del ensayo de alelos descrito en Valenzuela *et al.* (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21 (6):652-659).

El método para producir un animal no humano modificado genéticamente puede dar como resultado que el animal cuyo genoma comprende un locus del TCR humanizado sin reordenar (por ejemplo, un locus del TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , TCR $\delta$  y/o TCR $\gamma$  sin reordenar humanizado). Se desvela un método para generar animales no humanos modificados genéticamente (por ejemplo, roedor, por ejemplo, ratón o rata) que expresa un receptor de linfocitos T que comprende una región variable humana y una región constante no humana (por ejemplo, de roedor, por ejemplo, ratón o rata) en una superficie de un linfocito T en donde el método comprende insertar, por ejemplo, reemplazar, en un primer animal no humano un locus endógeno de un gen TCR $\alpha$  variable no humano con un locus de gen TCR $\alpha$  variable humanizado

sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\alpha$  humano y al menos un segmento J $\alpha$  humano, en donde el locus génico variable del TCR $\alpha$  humanizado está unido operativamente a la región constante del TCR $\alpha$  endógeno; insertar, por ejemplo, reemplazar en un segundo animal no humano un locus génico variable del TCR $\beta$  no humano endógeno con un locus génico variable del TCR $\beta$  humanizado sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\beta$  humano, un segmento D $\beta$  humano y un segmento J $\beta$  humano, en donde el locus génico variable del TCR $\beta$  humanizado está unido operativamente a la región constante del TCR $\beta$  endógeno; y reemplazar el primer y el segundo animales no humanos para obtener un animal no humano que expresa un receptor de linfocitos T que comprende una región variable humana y una región constante no humana. Se desvelan métodos de producción de un animal no humano modificado genéticamente cuyo genoma comprende un locus del TCR $\alpha$  humanizado sin reordenar, o un animal no humano cuyo genoma comprende un locus del TCR $\beta$  humanizado sin reordenar. Los reemplazos pueden realizarse en los loci endógenos. El método puede comprender una estrategia de humanización progresiva, en donde se introduce una construcción que comprende segmentos de la región variable adicionales en células ES en cada etapa posterior de humanización, en última instancia, dando como resultado un ratón que comprende un repertorio completo de segmentos de regiones variables humanas (véanse, por ejemplo, las **FIG. 4A y 4B**).

También se desvela un método de modificación de un locus génico variable del TCR (por ejemplo, un locus génico del TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , TCR $\delta$  y/o TCR $\gamma$ ) de un animal no humano para expresar una proteína TCR humanizada descrita en el presente documento. Se desvela un método de modificación de un locus génico variable del TCR para expresar una proteína TCR humanizada en una superficie de un linfocito T en donde el método comprende insertar, por ejemplo, reemplazar, en un animal no humano, un locus génico variable del TCR no humano endógeno con un locus génico variable del TCR humanizado sin reordenar. En una divulgación en donde el locus génico variable del TCR es un locus génico variable del TCR $\alpha$ , el locus génico variable del TCR humanizado sin reordenar comprende al menos un segmento V $\alpha$  humano y al menos un segmento J $\alpha$  humano. En una divulgación en donde el locus génico variable del TCR es un locus génico variable del TCR $\beta$ , el locus génico variable del TCR humanizado sin reordenar comprende al menos un segmento V $\beta$  humano, al menos un segmento D $\beta$  humano y al menos un segmento J $\beta$  humano. El locus génico variable del TCR humanizado sin reordenar puede estar unido operativamente a la correspondiente región constante del TCR no humano endógeno.

Por lo tanto, también se desvelan construcciones de nucleótidos para generar animales modificados por ingeniería genética que comprenden genes de la región variable del TCR humanizado. La construcción de nucleótidos puede comprender: brazos de homología 5' y 3', un fragmento de ADN humano que comprende un segmento o segmentos génicos de la región variable del TCR humano y un casete de selección flanqueado por sitios de recombinación. El fragmento de ADN humano puede ser un fragmento del gen del TCR $\alpha$  y comprende al menos un segmento de la región variable del TCR $\alpha$  humano. El fragmento de ADN humano puede ser un fragmento del TCR $\beta$  y comprende al menos un segmento génico de la región variable del TCR $\beta$  humano. Al menos un brazo de homología puede ser un brazo de homología no humano y es homólogo al locus del TCR no humano (por ejemplo, locus del TCR $\alpha$  o TCR $\beta$  no humano).

En diversos aspectos de la invención, la secuencia o secuencias que codifican polipéptidos de MHC I y MHC II quiméricos humanos/no humanos se ubican en el locus del MHC no humano endógeno (por ejemplo, locus de H-2K y/o H-2E de ratón). En una realización, esto da como resultado la colocación, por ejemplo, el reemplazo, de un gen o genes del MHC endógenos o una porción de los mismos con una secuencia o secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos del MHC I humanos o humanizados. Puesto que las secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos del MHC I, MHC II  $\alpha$  y MHC II  $\beta$  se ubican en proximidad a entre sí sobre el cromosoma, con el fin de conseguir el mayor éxito en la humanización de tanto el MHC I como el MHC II en un animal, los loci de MHC I y MHC II deben abordarse secuencialmente. Por lo tanto, en el presente documento también se desvelan métodos de generación de un animal no humano modificado genéticamente que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos del MHC I, MHC II  $\alpha$  y MHC II  $\beta$  quiméricos humanos/no humanos que se describen en el presente documento.

Por lo tanto, se desvela una construcción de nucleótidos para generar animales modificados por ingeniería genética que comprenden MHC quimérico humano/no humano. La construcción de ácido nucleico puede comprender: brazos de homología 5' y 3' no humanos, un fragmento de ADN que comprende las secuencias del gen del MHC humano (por ejemplo secuencias génicas de HLA-A2 humano o HLA-DR humano) y un casete de selección flanqueado por sitios de recombinación. El fragmento de ADN humano puede ser un fragmento genómico que comprende tanto intrones como exones de un gen del MHC humano (por ejemplo gen de HLA-A2 o HLA-DR2 humano). Los brazos de homología no humanos pueden ser homólogos a un locus del MHC no humano (por ejemplo, locus del MHC I o MHC II).

Los brazos de homología 5' y 3' no humanos comprenden una secuencia genómica en las ubicaciones 5' y 3', respectivamente, de un locus de gen del MHC de clase I o clase I no humano (por ejemplo, murino) endógeno (por ejemplo, 5' de la primera secuencia líder y 3' del exón  $\alpha 3$  del gen del MHC I de ratón o en la dirección 5' del gen de H-2Ab1 de ratón y en la dirección 3' del gen de H-2Ea de ratón). En una realización, el locus del MHC de clase I endógeno se selecciona de H-2K, H-2D y H-2L de ratón. En una realización específica, el locus del MHC de clase I endógeno es H-2K de ratón. En una realización, el locus del MHC II endógeno se selecciona de H-2E y H-2A de ratón. En una realización, la construcción del MHC II modificada por ingeniería genética permite el reemplazo de ambos genes de H-2E y H-2A de ratón. En una realización, el ratón no expresa polipéptidos del MHC endógenos funcionales a partir

de su locus de H-2D endógeno. En algunas realizaciones, el ratón está modificado por ingeniería genética para carecer total o parcialmente de un locus H-2D endógeno. En otra realización, el ratón no expresa ningún polipéptido del MHC I y MHC II endógeno funcional en la superficie celular. En una realización, los únicos MHC I y MHC II expresados por el ratón en una superficie celular son MHC I y MHC II quiméricos humanos/de ratón.

La divulgación también proporciona métodos para generar un animal no humano modificado por ingeniería genética (por ejemplo, un roedor modificado por ingeniería genética, por ejemplo, un ratón o una rata) cuyo genoma comprende un locus de la  $\beta 2$  microglobulina que codifica un polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina humano o humanizado. En un aspecto, los métodos dan como resultado un roedor modificado por ingeniería genética, por ejemplo, ratón, cuyo genoma comprende en un locus de la  $\beta 2$  microglobulina endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina humano o humanizado. En algunos casos, el ratón no expresa una  $\beta 2$  microglobulina de ratón funcional a partir de un locus de la  $\beta 2$  microglobulina de ratón endógeno. Los métodos pueden utilizar una construcción de direccionamiento, por ejemplo, fabricada con tecnología VELOCIGENE®, introduciendo la construcción en células ES, e introduciendo los clones de células ES dirigidos en un embrión de ratón, por ejemplo, usando la tecnología VELOCIMOUSE®, como se describe en el presente documento.

También se desvela una construcción de nucleótidos utilizada para generar animales no humanos modificados por ingeniería genética. La construcción de nucleótidos puede comprender: brazos de homología 5' y 3' no humanos, un fragmento de ADN humano que comprende secuencias de la  $\beta 2$  microglobulina humana y un casete de selección flanqueado por sitios de recombinación. El fragmento de ADN humano puede ser un fragmento genómico que comprende tanto intrones como exones de un gen de la  $\beta 2$  microglobulina humano. Los brazos de homología no humanos pueden ser homólogos a un locus de la  $\beta 2$  microglobulina no humano. El fragmento genómico puede comprender los exones 2, 3 y 4 del gen de la  $\beta 2$  microglobulina humano. En un caso, el fragmento genómico comprende, de 5' a 3': exón 2, intrón, exón 3, intrón y exón 4, todos de la secuencia de la  $\beta 2$  microglobulina humana. El casete de selección puede ubicarse en cualquier lugar de la construcción fuera de la región codificante de la  $\beta 2$  microglobulina, por ejemplo, puede ubicarse 3' del exón 4 de la  $\beta 2$  microglobulina humana. Los brazos de homología 5' y 3' no humanos pueden comprender la secuencia genómica 5' y 3' del gen de la  $\beta 2$  microglobulina no humano endógeno, respectivamente. Los brazos de homología 5' y 3' no humanos pueden comprender la secuencia genómica 5' del exón 2 y 3' del exón 4 del gen no humano endógeno, respectivamente.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método de modificación de un locus de la  $\beta 2$  microglobulina de un animal no humano (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata) para expresar un polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina humano o humanizado descrito en el presente documento. Un método de modificación de un locus de la  $\beta 2$  microglobulina de un animal no humano, por ejemplo, ratón, para expresar un polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina humano o humanizado, comprende reemplazar en un locus endógeno de la  $\beta 2$  microglobulina una secuencia de nucleótidos que codifica una  $\beta 2$  microglobulina de ratón con una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina humano o humanizado. En una realización de dicho método, el animal no humano, por ejemplo, el ratón no expresa un polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina funcional de un organismo no humano endógeno, por ejemplo, locus de la  $\beta 2$  microglobulina de ratón. En algunas realizaciones específicas, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina humano o humanizado comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en los exones 2 a 4 de un gen de la  $\beta 2$  microglobulina humano. En otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina humano o humanizado comprende secuencias de nucleótidos expuestas en los exones 2, 3 y 4 de un gen de la  $\beta 2$  microglobulina humano.

Se presentan diversos ejemplos de los loci humanizados descritos en el presente documento en las **FIG. 2-5**.

Tras completar el direccionamiento del gen, las células ES no humanas o los animales no humanos modificados genéticamente se criban para confirmar la incorporación correcta de la secuencia de nucleótidos exógena de interés o la expresión del polipéptido exógeno. Los expertos en la materia conocen numerosas técnicas que incluyen (pero sin limitación) transferencia Southern, PCR larga, PCR cuantitativa (por ejemplo, PCR en tiempo real usando TAQMAN®), hibridación *in situ* con fluorescencia, transferencia Northern, citometría de flujo, análisis por transferencia Western, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, etc. En un ejemplo, los animales no humanos (por ejemplo, ratones) que portan la modificación genética de interés pueden identificarse mediante cribado para la pérdida de alelos del ratón y/o la ganancia de alelos humanos usando una modificación del ensayo de alelos descrito en Valenzuela *et al.* (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659. Los expertos en la materia conocen otros ensayos que identifican una secuencia de nucleótidos o aminoácidos específica en los animales modificados genéticamente.

Los animales pueden generarse en el presente documento mediante reproducción.

Por ejemplo, un animal no humano que comprende el CD8 quimérico humano/no humano descrito en el presente documento y el MHC I y/o la  $\beta 2$  microglobulina humanizados puede generarse reproduciendo un animal que comprende un locus de CD8 quimérico (por ejemplo, locus de CD8  $\alpha$  y/o  $\beta$  quimérico) como se describe en el presente documento con un animal que comprende un locus del MHC I y/o la  $\beta 2$  microglobulina humanizado. El animal también puede generarse introduciendo en células ES de un animal no humano que comprende el locus del MHC I y/o la  $\beta 2$  microglobulina humanizados una secuencia de nucleótidos que codifica CD8 quimérico (por ejemplo, CD8  $\alpha$  y/o  $\beta$

quimérico), por ejemplo, para el reemplazo en el locus de CD8 endógeno (por ejemplo, locus de CD8  $\alpha$  y/o  $\beta$  quimérico); o introducir en células ES de un animal no humano que comprende un locus de CD8 quimérico (por ejemplo, locus de CD8  $\alpha$  y/o  $\beta$  quimérico) una secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican MHC I y/o  $\beta 2$  microglobulina humanizadas.

El animal que comprende un locus de CD8 quimérico puede reproducirse primero con un animal que comprende un locus génico variable del TCR humanizado para crear un animal que comprende loci de la región variable del TCR y el CD8 humanizados, que después puede reproducirse con un animal que comprende loci del MHC I humanizado y/o de la  $\beta 2$  microglobulina humanizados para generar un animal que comprende MHC I humanizado, gen variable del TCR y/o loci de la  $\beta 2$  microglobulina. Como alternativa, el animal que comprende loci del MHC I y/o de la  $\beta 2$  microglobulina humanizados puede reproducirse en primer lugar con un animal que comprende un locus génico variable del TCR humanizado para crear un animal que comprende loci de la región variable del MHC I y TCR humanizado, que después se cruza con un animal que comprende un locus de CD8 quimérico para generar un animal que comprende el MHC I humanizado, el gen variable del TCR y/o loci de  $\beta 2$  microglobulina, respectivamente.

El animal no humano que comprende un CD4 quimérico humano/no humano y el MHC II humanizado pueden generarse reproduciendo un animal que comprende un locus de CD4 quimérico como se describe en el presente documento con un animal que comprende un locus del MHC II humanizado. El animal también puede generarse introduciendo en células ES de un animal no humano que comprende el locus del MHC II humanizado una secuencia de nucleótidos que codifica CD4 quimérico, por ejemplo, para el reemplazo en el locus de CD4 endógeno; o introducir en células ES de un animal no humano que comprende un locus de CD4 quimérico una secuencia de nucleótidos que codifica el MHC II humanizado.

El animal que comprende un locus de CD4 quimérico puede reproducirse primero con un animal que comprende un locus génico variable del TCR humanizado para crear un animal que comprende loci de la región variable del TCR y el CD4 humanizados, que después puede cruzarse con un animal que comprende un locus del MHC II humanizado para generar un animal que comprende loci génicos variables de CD4, MHC II y TCR humanizados. Como alternativa, el animal que comprende un locus del MHC II humanizado puede reproducirse en primer lugar con un animal que comprende un locus génico variable del TCR humanizado para crear un animal que comprende loci de la región variable del TCR y el MHC II humanizados, que después puede reproducirse con un animal que comprende un locus de CD4 quimérico para generar un animal que comprende el MHC II humanizado, el gen variable del TCR y/o loci de  $\beta 2$  microglobulina, respectivamente.

Un animal no humano que comprende el CD8 quimérico humano/no humano descrito en el presente documento y el MHC I y/o la  $\beta 2$  humanizada humanizados se reproduce con un animal que comprende un locus de CD4 quimérico como se describe en el presente documento y un animal que comprende un locus del MHC II humanizado para generar un animal no humano que comprende polipéptidos de CD4 y CD8 quiméricos y moléculas del MHC I (y/o  $\beta 2$  microglobulina) y MHC II humanizadas. El animal que comprende polipéptidos de CD4 y CD8 quiméricos humanos/no humanos y moléculas del MHC I y MHC II humanizadas se puede reproducir con un animal que comprende un dominio variable del TCR humanizado para generar un animal que comprende un sistema inmunitario de linfocitos T sustancialmente humanizado, por ejemplo, polipéptidos de CD4 y CD8 quiméricos humanos/no humanos, moléculas del MHC I (y/o la  $\beta 2$  microglobulina) y MHC humanizadas II y dominios variables del TCR humanizado.

Cualquiera de los animales no humanos modificados genéticamente (por ejemplo, ratón) descritos en el presente documento puede comprender una o dos copias de los genes que codifican CD8 quimérico humano/no humano (por ejemplo, CD8 $\alpha$  y/o CD8 $\beta$ ); CD4 quimérico humano/no humano; MHC I humano o humanizado;  $\beta 2$  microglobulina humana o humanizada; MHC II humano o humanizado (por ejemplo, MHC II $\alpha$  y/o MHC II $\beta$ ); y TCR humano o humanizado (por ejemplo, TCR  $\alpha$  y/o TCR $\beta$ ). En consecuencia, el animal puede ser heterocigoto u homocigoto para cualquiera o todos estos genes.

#### **Uso de animales no humanos modificados genéticamente que generan respuestas inmunitarias de linfocitos T sustancialmente humanizados**

Un animal no humano modificado genéticamente, por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratones o ratas, que comprende CD4 y MHC II humanizados o CD8 y MHC I humanizados (y  $\beta 2$  microglobulina), o ambos, presentan péptidos a los linfocitos T (linfocitos T CD4+ o CD8+, respectivamente) de manera similar a la humana, ya que, sustancialmente, todos los componentes del complejo son humanos o humanizados. Los animales no humanos modificados genéticamente se pueden usar para estudiar la función del sistema inmunitario humano en el animal humanizado; para la identificación de antígenos y epítopos antigénicos que desencadenan la respuesta inmunitaria (por ejemplo, epítopos de linfocitos T, por ejemplo, epítopos únicos de cáncer humano), por ejemplo, para su uso en el desarrollo de vacunas; para la identificación de linfocitos T de alta afinidad con patógenos humanos o antígenos cancerosos (es decir, linfocitos T que se unen a antígenos en el contexto del complejo MHC I humano con alta afección), por ejemplo, para su uso en terapia con linfocitos T adaptativa; para la evaluación de candidatos de vacunas y otras estrategias de vacunas; para estudiar la autoinmunidad humana; para estudiar las enfermedades infecciosas humanas; y de otro modo para diseñar mejores estrategias terapéuticas basadas en la expresión de MHC humano y CD4/CD8.

Por lo tanto, los animales modificados genéticamente pueden ser útiles, entre otras cosas, para evaluar la capacidad de un antígeno para iniciar una respuesta inmunitaria en un ser humano, y para generar una diversidad de antígenos e identificar un antígeno específico que puede usarse en el desarrollo de vacunas humanas.

- 5 Se desvela un método para determinar si un péptido provocará una respuesta inmunitaria celular en un ser humano, que comprende exponer un animal no humano modificado genéticamente como se describe en el presente documento al péptido, permitiendo que el animal no humano genere una respuesta inmunitaria, y detectar en el animal no humano una célula (por ejemplo, un linfocito T CD8+ o CD4+, que comprende un CD8 o CD4 humano, respectivamente) que se une a una secuencia del péptido presentado por una molécula del MHC I o II quimérica humana/no humana como se describe en el presente documento. En una divulgación, el animal no humano después de la exposición comprende un linfocito T citotóxico CD8+ (CTL) restringido por MHC de clase I que se une al péptido. En otra realización, el animal no humano después de la exposición comprende un linfocito T CD4+ restringido por MHC II que se une al péptido.

- 15 Se desvela un método para identificar un epítipo de linfocitos T humanos que comprende exponer un animal no humano como se describe en el presente documento a un antígeno que comprende un supuesto epítipo de linfocitos T, permitiendo que el animal no humano genere una respuesta inmunitaria, aislar del animal no humano un linfocito T restringido por MHC de clase I o MHC de clase II que se une al epítipo, e identificar el epítipo unido por dicho linfocito T.

- 20 Se desvela un método para identificar un antígeno que genera una respuesta de linfocitos T citotóxicos en un ser humano, que comprende exponer un supuesto antígeno a un ratón como se describe en el presente documento, permitiendo que el ratón genere una respuesta inmunitaria e identificando el antígeno unido por la molécula restringida por HLA de clase I o de clase II.

- 25 Se desvela un método para determinar si un supuesto antígeno contiene un epítipo que, tras la exposición a un sistema inmunitario humano generará una respuesta inmunitaria restringida por HLA de clase I, que comprende exponer un ratón como se describe en el presente documento al supuesto antígeno y medir una respuesta inmunitaria restringida por HLA de clase I o HLA de clase II específica de antígeno en el ratón.

- 30 Los animales no humanos modificados por ingeniería genética descritos en el presente documento pueden ser útiles para la identificación de receptores de linfocitos T, por ejemplo, receptores de linfocitos T de alta avidez, que reconocen un antígeno de interés, por ejemplo, un tumor u otro antígeno de enfermedad. El método puede comprender: exponer el animal no humano descrito en el presente documento a un antígeno, permitir que el animal no humano genere una respuesta inmunitaria al antígeno, aislar del animal no humano un linfocito T que comprende un receptor de linfocitos T que se une al antígeno presentado por un MCH I o MCH II humano o humanizado y determinar la secuencia de dicho receptor de linfocitos T.

- 40 Los animales no humanos que expresan un repertorio diverso de segmentos del gen del TCR V(D)J humano funcional pueden ser útiles para el estudio de enfermedades humanas. En consecuencia, los animales no humanos modificados genéticamente descritos en el presente documento pueden expresar un repertorio del TCR sustancialmente similar a un repertorio del TCR expresado en un ser humano, por ejemplo, el repertorio del TCR de un animal no humano desvelado en el presente documento puede derivar de al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 97 % o al menos aproximadamente el 99 % de todos los segmentos génicos de TCR  $\alpha$ , TCR  $\beta$ , TCR $\gamma$  y/o TCR $\delta$  humanos funcionales. En un animal no humano que se desvela expresa un repertorio del TCR derivado de

- 50 (i) al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 97 % o al menos aproximadamente el 99 % de todos los segmentos génicos del TCR V $\alpha$  humanos funcionales;

- 55 (ii) al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 97 % o al menos aproximadamente el 99 % de todos los segmentos génicos del TCR J $\alpha$  humanos funcionales;

- 60 (iii) al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 97 % o al menos aproximadamente el 99 % de todos los segmentos génicos del TCR V $\beta$  humanos funcionales;

- 65 (iv) al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 97 % o al menos aproximadamente el 99 % de todos los segmentos génicos del TCR J $\beta$  humanos funcionales;

menos aproximadamente el 99 % de todos los segmentos génicos del TCR D $\beta$  humanos funcionales; y/o

(v) al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, al menos aproximadamente el 97 % o al menos aproximadamente el 99 % de todos los segmentos génicos del TCR J $\beta$  humanos funcionales.

El ratón puede producir un repertorio de linfocitos T que comprende todos o sustancialmente todos los segmentos génicos del TCR V $\alpha$  humanos funcionales, y que comprende todos o sustancialmente todos los segmentos génicos del TCR V $\beta$  humanos funcionales. El ratón desvelado en el presente documento utiliza genes TCR V $\alpha$  y/o V $\beta$  humanos con una frecuencia similar a la frecuencia de los genes TCR V $\alpha$  y/o V $\beta$  humanos, respectivamente, utilizados por los linfocitos T humanos en un ser humano. Los métodos de detección de los segmentos génicos expresados en el repertorio del TCR del animal no humano incluyen, por ejemplo, métodos de citometría de flujo y/o secuenciación (por ejemplo, la PCR en tiempo real, la secuenciación de última generación, etc.).

Se desvela un método para determinar la activación de linfocitos T por un supuesto agente terapéutico humano, que comprende exponer un animal modificado genéticamente como se describe en el presente documento a un supuesto agente terapéutico humano (o, por ejemplo, exponer una célula que expresa un MHC II o MHC I humano o humanizado de dicho animal a una secuencia peptídica del supuesto agente terapéutico), exponer una célula del animal modificado genéticamente que muestra un complejo MHC/péptido humano o humanizado a un linfocito T que comprende un CD4 o CD8 quimérico humano/no humano (por ejemplo, humano/de ratón) capaz de unirse a la célula del animal modificado genéticamente, y medir la activación del linfocito T inducida por la célula presentadora de péptidos del animal modificado genéticamente.

Además de la capacidad de identificar antígenos y epítomos de antígenos de patógenos o neoplasias humanas, los animales modificados genéticamente de la invención pueden usarse para identificar autoantígenos relevantes para enfermedades autoinmunitarias humanas, por ejemplo, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, etc. Igualmente, los animales modificados por ingeniería genética pueden usarse para estudiar diversos aspectos de las enfermedades autoinmunitarias humanas y pueden utilizarse como modelos de enfermedades autoinmunitarias.

Los animales no humanos modificados por ingeniería genética desvelados en el presente documento pueden producir linfocitos T con moléculas del TCR humanizadas en su superficie y, como resultado, reconocerían los péptidos que les presentan los complejos MHC de forma similar a la humana. Los animales no humanos modificados por ingeniería genética descritos en el presente documento pueden usarse para estudiar el desarrollo y la función de los linfocitos T humanos y los procesos de tolerancia inmunitaria; para someter a ensayo candidatos a vacunas humanas; generar TCR con determinadas especificidades para la terapia génica de TCR; para generar bibliotecas de TCR para antígenos asociados a enfermedades (por ejemplo, antígenos asociados a tumores (TAA, por sus siglas en inglés); etc.

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

Se han realizado intentos de iniciar una terapia génica de TCR en la que los linfocitos T se seleccionan o se programan para atacar a un antígeno de interés, por ejemplo, un TAA. La terapia génica de TCR actual se basa en la identificación de secuencias de los TCR que se dirigen a antígenos específicos, por ejemplo, antígenos asociados a tumores. Por ejemplo, Rosenberg y sus colaboradores han publicado varios estudios en los que transdujeron linfocitos de sangre periférica derivados de un paciente con melanoma con genes que codifican cadenas TCR $\alpha$  y  $\beta$  específicas para epítomos del antígeno MART-1 asociado al melanoma, y usaron linfocitos expandidos resultantes para la terapia adoptiva con linfocitos T. Johnson *et al.* (2009) Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen, *Blood* 114:535-46; Morgan *et al.* (2006) Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes, *Science* 314:126-29. Los TCR específicos de MART-1 se aislaron de pacientes que experimentaron regresión tumoral después de la terapia con TIL. Sin embargo, la identificación de dichos TCR, particularmente los TCR de alta avidéz (que tienen más probabilidades de ser terapéuticamente útiles), se complica por el hecho de que la mayoría de los antígenos tumorales son autoantígenos, y los TCR que se dirigen a estos antígenos con frecuencia están suprimidos o poseen una afinidad subóptima, debido principalmente a la tolerancia inmunitaria.



En diversas realizaciones, la presente divulgación resuelve este problema proporcionando roedores modificados genéticamente que comprenden en su genoma un locus génico variable del TCR humano sin reordenar. El animal no humano descrito en el presente documento es capaz de generar linfocitos T con un repertorio diverso de receptores de linfocitos T humanizados. Por lo tanto, los animales no humanos descritos en el presente documento pueden ser una fuente de un repertorio diverso de receptores de linfocitos T humanizados, por ejemplo, receptores de linfocitos T humanizados de alta avidez para su uso en la transferencia de linfocitos T adoptivos.

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

En el presente documento se desvela un método de producción de un receptor de linfocitos T humanos específico para un antígeno de interés (por ejemplo, un antígeno asociado a una enfermedad) que comprende inmunizar un animal no humano desvelado en el presente documento con el antígeno de interés; permitir que el animal genere una respuesta inmunitaria; aislar del animal un linfocito T reactivo al antígeno de interés; determinar una secuencia de ácido nucleico de una región variable del TCR humana expresada por el linfocito T; clonar la región variable del TCR humana en una construcción de nucleótidos que comprende una secuencia de ácido nucleico de una región constante del TCR humana de manera que la región variable del TCR humana esté unida operativamente a la región constante del TCR humana; y expresar a partir de la construcción un receptor de linfocitos T humanos específico para el antígeno de interés. Las etapas para aislar un linfocito T, determinar una secuencia de ácido nucleico de una región variable del TCR humana expresada por el linfocito T, clonar la región variable del TCR humana en una construcción de nucleótidos que comprende una secuencia de ácido nucleico de una región constante del TCR humana y la expresión de un receptor de linfocitos T humanos se realizan usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia.

La secuencia de nucleótidos que codifica un receptor de linfocitos T específico para un antígeno de interés puede expresarse en una célula. La célula que expresa el TCR puede seleccionarse de una célula CHO, COS, 293, HeLa, PERC.6™, etc.

El antígeno de interés puede ser cualquier antígeno que se sepa que provoca o se asocia a una enfermedad o afección, por ejemplo, un antígeno asociado a tumor; un antígeno de origen vírico, bacteriano u otro origen patógeno; etc. En la técnica se conocen muchos antígenos asociados a tumores. Se presenta una selección de antígenos asociados a tumores en Cancer Immunity (A Journal of the Cancer Research Institute) Peptide Database ([archive.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm](http://archive.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm)). El antígeno de interés puede ser un antígeno humano, por ejemplo, un antígeno asociado a tumores humanos. El antígeno puede ser un antígeno intracelular específico de tipo celular y se usa un receptor de linfocitos T para destruir una célula que expresa el antígeno.

En el presente documento se desvela un método de identificación de un linfocito T con especificidad contra un antígeno de interés, por ejemplo, un antígeno asociado a tumor, que comprende inmunizar un animal no humano descrito en el presente documento con el antígeno de interés, permitir que el animal genere una respuesta inmunitaria y aislar del animal no humano un linfocito T con especificidad por el antígeno.

En el presente documento se desvelan nuevos métodos para la terapia con linfocitos T adoptivos. Por lo tanto, en el presente documento se desvela un método de tratamiento o mejora una enfermedad o afección (por ejemplo, un cáncer) en un sujeto (por ejemplo, un sujeto mamífero, por ejemplo, un sujeto humano) que comprende inmunizar un animal no humano descrito en el presente documento con un antígeno asociado a la enfermedad o afección, permitiendo al animal generar una respuesta inmunitaria, aislar del animal una población de linfocitos T específicos de antígeno e infundir linfocitos T específicos de antígeno aislados en el sujeto. En el presente documento se desvela un método de tratamiento o mejora de una enfermedad o afección en un sujeto humano, que comprende inmunizar el animal no humano descrito en el presente documento con un antígeno de interés (por ejemplo, un antígeno asociado a una enfermedad o afección, por ejemplo, un antígenos asociado a tumores), permitiendo al animal generar una respuesta inmunitaria, aislar del animal una población de linfocitos T específicos de antígeno, determinar la secuencia de ácido nucleico de un receptor de linfocitos T, (por ejemplo, una primera y/o segunda secuencia de ácido nucleico que codifica el gen de la región variable del TCR $\alpha$  humano reordenado y/o del gen de la región variable del TCR $\beta$  humano reordenado); una tercera y/o cuarta secuencia de ácido nucleico que codifica el gen de la región variable del TCR $\delta$  reordenado humano o un gen de la región variable del TCR $\gamma$ , expresado por los linfocitos T específicos de antígeno, clonar la secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T, por ejemplo, la primera, segunda, tercera y/o cuarta secuencia de ácido nucleico que codifica respectivamente el gen de la región variable del TCR $\alpha$  humano reordenado, el gen de la región variable del TCR $\beta$  reordenado humano, el gen de la región variable del TCR $\delta$  o un gen de la región variable del TCR $\gamma$ , en un vector de expresión (por ejemplo, un vector retroviral), por ejemplo, opcionalmente en donde la primera, segunda, tercera y/o cuarta secuencia de ácido nucleico que codifica respectivamente el gen de la región variable del TCR $\alpha$  humano reordenado, el gen de la región variable del TCR $\beta$  reordenado humano, El gen de la región variable del TCR $\delta$  o un gen de la región variable del TCR $\gamma$  se clona respectivamente en fase con un gen constante del TCR $\alpha$  humano, gen constante del TCR $\beta$  humano, gen constante

del TCR $\delta$  o un gen constante del TCR $\gamma$ , introduciendo el vector en linfocitos T derivados del sujeto de manera que los linfocitos T expresen el receptor de linfocitos T específico de antígeno e infundir los linfocitos T en el sujeto. La secuencia de ácido nucleico del receptor de linfocitos T puede humanizarse adicionalmente antes de su introducción en linfocitos T derivados del sujeto, por ejemplo, la secuencia que codifica la región constante no humana se modifica para parecerse aún más a una región constante del TCR humana (por ejemplo, la región constante no humana se reemplaza con una región constante humana). La enfermedad o afección puede ser un cáncer. Se puede expandir una población de linfocitos T específicos de antígeno antes de infundirla en el sujeto. La población de células inmunitarias del sujeto se inmunoagota antes de la infusión de linfocitos T específicos de antígeno. El TCR específico de antígeno puede ser un TCR de alta avidez, por ejemplo, un TCR de alta avidez por un antígeno asociado a tumor. El linfocito T puede ser un linfocito T citotóxico. La enfermedad o afección puede ser provocada por un virus o una bacteria.

Una enfermedad o afección puede ser una enfermedad autoinmunitaria. Los linfocitos TREG son una subpoblación de linfocitos T que mantienen la tolerancia a los autoantígenos y previenen la autorreactividad patológica. Por lo tanto, en el presente documento también se desvelan métodos de tratamiento de enfermedades autoinmunitarias que se basan en la generación de linfocitos TREG específicos de antígeno en el animal no humano desvelado en el presente documento.

En el presente documento también se desvela un método para de tratamiento o mejora de una enfermedad o afección (por ejemplo, un cáncer) en un sujeto que comprende introducir las células afectadas por la enfermedad o afección (por ejemplo, células cancerosas) del sujeto en un animal no humano, permitir que el animal genere una respuesta inmunitaria al antígeno, aislar del animal una población de linfocitos T reactivos a las células, determinar la secuencia de ácido nucleico de un dominio variable del receptor de linfocitos T expresado por los linfocitos T, clonar la secuencia que codifica el dominio variable del receptor de linfocitos T en un vector (por ejemplo, en fase y unido operativamente a un gen constante del TCR humano), introducir el vector en linfocitos T derivados del sujeto e infundir en el sujeto linfocitos T del sujeto que albergan el receptor de linfocitos T.

En el presente documento también se desvela el uso de un animal no humano como se describe en el presente documento para producir secuencias de ácido nucleico que codifican dominios variables del TCR humano (por ejemplo, dominios variables del TCR  $\alpha$  y/o  $\beta$ ). Se desvela un método para generar una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio variable del TCR humano, que comprende inmunizar un animal no humano como se describe en el presente documento con un antígeno de interés, permitir que el animal no humano genere una respuesta inmunitaria al antígeno de interés, y obtener a partir del mismo una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio variable del TCR humano que se une al antígeno de interés. El método puede comprender además elaborar una secuencia de ácido nucleico que codifique un dominio variable del TCR humano que esté unido operativamente a una región constante del TCR no humano, que comprende aislar un linfocito T de un animal no humano descrito en el presente documento y obtener del mismo la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio variable del TCR unido a la región constante del TCR no humana, y clonar la secuencia o secuencias de ácido nucleico que codifican el dominio variable del TCR dominio (por ejemplo, una primera, segunda, tercera o cuarta secuencia de ácido nucleico que codifica respectivamente un gen de la región variable del TCR $\alpha$  humano reordenado, el gen de la región variable del TCR $\beta$  reordenado humano, gen de la región variable del TCR $\delta$  o un gen de la región variable del TCR $\gamma$ ) en fase con una región constante humana adecuada (por ejemplo, un gen de la región constante del TCR $\alpha$  humano, gen de la región constante del TCR $\beta$  humano, gen de la región constante del TCR $\delta$  o un gen de la región variable del TCR $\gamma$ , respectivamente).

Por lo tanto, en el presente documento se desvelan secuencias de ácido nucleico de la región variable del TCR, tales como secuencias de ácidos nucleicos variables del TCR reordenadas, por ejemplo, secuencias de ácido nucleico de la región variable del TCR $\alpha$  y/o TCR $\beta$  reordenadas, generadas en los animales no humanos descritos en el presente documento, y codificadas respectivamente por, por ejemplo, una secuencia del gen V $\alpha$ /J $\alpha$  humano reordenado y una secuencia del gen V $\beta$ D $\beta$ J $\beta$  humano reordenado. Igualmente, se desvelan secuencias de aminoácidos de la región variable del TCR codificadas por dichas secuencias de ácidos nucleicos de la región variable del TCR reordenadas. Dichas secuencias de ácidos nucleicos de la región variable del TCR reordenadas (secuencias de ácidos nucleicos de la región variable del TCR $\alpha$  y/o TCR $\beta$ ) obtenidas en los animales no humanos descritos en el presente documento pueden clonarse en unión operativa con la región constante del TCR humana (región constante del TCR $\alpha$  y/o TCR $\beta$ ), y utilizarse para diversos usos descritos en el presente documento, por ejemplo, como producto terapéutico humano, en un ser humano.

También se desvela en el presente documento el uso de un animal no humano como se describe en el presente documento para hacer un tratamiento humano terapéutico, que comprende inmunizar al animal no humano con un antígeno de interés (por ejemplo, un antígeno asociado a tumor), permitiendo que el animal no humano genere una respuesta inmunitaria, obtención del animal de linfocitos T reactivos al antígeno de interés, obtener de los linfocitos T una secuencia o secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína TCR humanizada o un dominio variable del TCR humano que se une al antígeno de interés, y emplear la secuencia o secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína TCR humanizada o un dominio variable del TCR humano en una terapia humana.

Por lo tanto, también se desvela un método para generar una terapia humana, que comprende inmunizar un animal

no humano como se describe en el presente documento con un antígeno de interés, permitiendo que el animal no humano genere una respuesta inmunitaria, obtención del animal de linfocitos T reactivos al antígeno de interés, obtener de los linfocitos T una secuencia o secuencias de ácido nucleico que codifican un receptor de linfocitos T humanizados que se une al antígeno de interés, y emplear el receptor de linfocitos T humanizados (o totalmente humanos) en una terapia humana.

El agente terapéutico humano puede ser un linfocito T (por ejemplo, un linfocito T humano, por ejemplo, un linfocito T derivado de un sujeto humano) que alberga una secuencia de ácido nucleico de interés (por ejemplo, transfectada o transducida o introducida de otro modo con el ácido nucleico de interés) de manera que el linfocito T expresa la proteína TCR humanizada con afinidad por un antígeno de interés. Un sujeto en quien se emplea el agente terapéutico puede necesitar terapia para una enfermedad o afección particular, y el antígeno se asocia a la enfermedad o afección. El linfocito T es un linfocito T primario, el antígeno es un antígeno asociado a un tumor y la enfermedad o afección es el cáncer. El linfocito T puede derivar del sujeto.

El agente terapéutico humano puede ser un receptor de linfocitos T. El receptor terapéutico puede ser un receptor de linfocitos T soluble. Se han ampliado muchos esfuerzos para generar receptores de linfocitos T solubles o regiones variables del TCR para su uso como agentes terapéuticos. La generación de receptores de linfocitos T solubles depende de la obtención de regiones variables del TCR reordenadas. Un enfoque es diseñar TCR monocatenarios que comprendan TCR $\alpha$  y TCR $\beta$ , y, de manera similar al formato de inmunoglobulina scFv, fusionarlos a través de un enlazador (véase, por ejemplo, la publicación internacional n.º WO 2011/044186). El scTv resultante, si es análogo a scFv, proporcionaría una forma térmicamente estable y soluble de proteína de unión a TCR $\alpha/\beta$ . Los enfoques alternativos incluyeron el diseño de un TCR soluble que tenía dominios constantes del TCR $\beta$  (véase, por ejemplo, Chung *et al.*, (1994) Functional three-domain single-chain T-cell receptors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 12654-58); además de modificar por ingeniería genética un enlace disulfuro no nativo en la interfaz entre los dominios constantes del TCR (revisado en Boulter y Jakobsen (2005) Stable, soluble, high-affinity, engineered T cell receptors: novel antibody-like proteins for specific targeting of peptide antigens, Clinical and Experimental Immunology 142:454-60; véase también, la patente de los EE.UU. n.º 7.569.664). Se han descrito otros formatos de receptores de linfocitos T solubles. Los animales no humanos descritos en el presente documento pueden usarse para determinar una secuencia de un receptor de linfocitos T que se une con alta afinidad a un antígeno de interés y, posteriormente, diseñar un receptor de linfocitos T soluble basado en la secuencia.

Puede usarse un receptor de linfocitos T soluble derivado de la secuencia del receptor TCR expresada por el animal no humano para bloquear la función de una proteína de interés, por ejemplo, una proteína vírica, bacteriana o asociada a tumores. Como alternativa, un receptor de linfocitos T soluble puede fusionarse a un resto que puede destruir una célula infectada o cancerosa, por ejemplo, una molécula citotóxica (por ejemplo, un quimioterápico), toxina, radionúclido, profármaco, anticuerpo, etc. También se puede fusionar un receptor de linfocitos T soluble a una molécula inmunomoduladora, por ejemplo, una citocina, quimiocina, etc. Un receptor de linfocitos T soluble también puede fusionarse a una molécula inmunoinhibidora, por ejemplo, una molécula que inhibe que un linfocito T destruya otras células que albergan un antígeno reconocido por el linfocito T. Pueden usarse dichos receptores de linfocitos T solubles fusionados a moléculas inmunoinhibidoras, por ejemplo, en el bloqueo de la autoinmunidad. Diversas moléculas inhibidoras inmunitarias de ejemplo que pueden fusionarse a un receptor de linfocitos T soluble se revisan en Ravetch y Lanier (2000) Immune Inhibitory Receptors, Science 290:84-89.

También se desvelan métodos para estudiar la respuesta inmunitaria en el contexto del TCR humano, incluyendo el reordenamiento del TCR humano, el desarrollo de linfocitos T, la activación de linfocitos T, la tolerancia inmunitaria, etc.

También se desvelan métodos para someter a ensayo candidatos a vacunas. En el presente documento se desvela un método de determinación de si una vacuna activará una respuesta inmunitaria (por ejemplo, proliferación celular, liberación de citocinas, etc.) y conducirá a la generación de linfocitos T efectoras, así como de memoria (por ejemplo, linfocitos T de memoria centrales y efectoras).

Se desvela una preparación *in vitro* que comprende un linfocito T que porta una proteína CD8 quimérica en su superficie y una segunda célula que se une al CD8 quimérico. La segunda célula puede ser una célula que expresa un polipéptido del MHC I, por ejemplo, una proteína MHC I quimérica humana/no humana. El CD8 quimérico en la superficie de la primera célula puede interactuar con el MHC I quimérico en la superficie de la segunda célula. La proteína quimérica CD8 puede conservar la interacción con moléculas citosólicas endógenas, por ejemplo, moléculas de señalización citosólicas endógenas (por ejemplo, Lck endógena, etc.).

Se desvela una preparación *in vitro* que comprende un linfocito T que porta una proteína CD4 quimérica en su superficie y una segunda célula que se une al CD4 quimérico. La segunda célula puede ser una célula, por ejemplo, una APC, que expresa un polipéptido del MHC II, por ejemplo, una proteína MHC II quimérica humana/no humana. El CD4 quimérico en la superficie de la primera célula puede interactuar con el MHC II quimérico en la superficie de la segunda célula. La proteína quimérica CD4 puede conservar la interacción con moléculas citosólicas endógenas, por ejemplo, moléculas de señalización citosólicas endógenas (por ejemplo, Lck endógena, etc.).

Otros usos de los animales modificados por ingeniería genética desvelados en el presente documento, es decir, animales que comprenden un correceptor de linfocitos T humano o humanizado (por ejemplo, CD4 o CD8 quimérico humano/no humano), que comprende además opcionalmente una proteína MHC II o I humana o humanizada, serán evidentes a partir de la presente divulgación.

## EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir a los expertos en la materia cómo preparar y usar los métodos y composiciones de la divulgación. Se han realizado esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. Los Ejemplos no incluyen descripciones detalladas de métodos convencionales que serían bien conocidos por los expertos en la materia (técnicas de clonación molecular, etc.). A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio, la temperatura se indica en grados Celsius y la presión es la atmosférica o casi atmosférica.

### **Ejemplo 1: Generación de ratones MHC II humanizados**

Las diversas etapas implicadas en la modificación por ingeniería genética de un ratón que comprende loci del MHC I y MHC II humanizados, con supresiones de loci del MHC I y MHC II endógenos correspondientes y adicionales (HLA-A21H-2K, HLA-DR2/H-2E, H-2A-del, H-2D-del) se representan en la **FIG. 3A**. La descripción detallada de las etapas aparece a continuación.

#### *Ejemplo 1.1: Generación y caracterización de ratones MHC I humanizados*

La generación de ratones MHC I humanizados se describió anteriormente en la publicación de patente de los EE.UU. n.º 20130111617. Brevemente, el gen de H-2K de ratón se humanizó en una única etapa mediante la construcción de un único vector de direccionamiento a partir de ADN (BAC) de cromosoma artificial bacteriano humano y de ratón usando la tecnología VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. n.º 6.586.251 y Valenzuela *et al.* (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. *Nat. Biotech.* 21(6): 652-659). Se modificó ADN de clon de BAC de ratón RP23-173k21 (Invitrogen) mediante recombinación homóloga para reemplazar el ADN genómico que codifica los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  del gen de H-2K de ratón con ADN genómico humano que codifica las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  del gen de HLA-A humano (**FIG. 2A**).

Específicamente, la secuencia genómica que codifica las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de ratón del gen de H-2K se reemplaza con el ADN genómico humano que codifica los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  del gen HLA-A\*0201 humano en un único evento de direccionamiento usando un vector de direccionamiento que comprende un casete de higromicina flanqueado por sitios *loxP* con un brazo de homología de ratón 5' que contiene la secuencia 5' del locus de H-2K de ratón que incluye la región sin traducir (UTR) de 5' y un brazo de homología de ratón 3' que contiene la secuencia genómica 3' de la secuencia codificante de H-2K  $\alpha 3$  de ratón.

La construcción final para dirigir el locus génico de H-2K endógeno de 5' a 3' incluía (1) un brazo de homología 5' que contenía -200 pb de secuencia genómica de ratón 5' del gen de H-2K endógeno que incluye la 5'UTR, (2) -1339 pb de secuencia genómica humana que incluye la secuencia líder de HLA-A\*0201, el líder/intrón  $\alpha 1$  de HLA-A\*0201, el exón  $\alpha 1$  de HLA-A\*0201, el intrón  $\alpha 1$ - $\alpha 2$  de HLA-A\*0201, el exón  $\alpha 2$  de HLA-A\*0201, -316 pb del extremo 5' del intrón  $\alpha 2$ - $\alpha 3$ , (3) un sitio *loxP* 5', (4) un casete de higromicina, (5) un sitio *loxP* 3', (6) -580 pb de una secuencia genómica humana que incluye -304 pb del extremo 3' del intrón  $\alpha 2$ - $\alpha 3$ , el exón  $\alpha 3$  de HLA-A\*0201 y (7) un brazo de homología 3' que contiene ~200 pb de secuencia genómica de ratón que incluye el intrón entre el H-2K  $\alpha 3$  de ratón y las secuencias codificantes transmembrana. La secuencia de 149 nucleótidos en el punto de unión de las secuencias de ratón/humana en 5' del vector de direccionamiento se expone en la SEQ ID NO: 90 y la secuencia de 159 nucleótidos en el punto de unión de las secuencias humana/de ratón en 3' del vector de direccionamiento se expone en la SEQ ID NO: 91. La recombinación homóloga con este vector de direccionamiento creó un locus de H-2K de ratón modificado que contenía ADN genómico humano que codificaba los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  del gen HLA-A\*0201 unido operativamente a las secuencias codificantes de dominio transmembrana y citoplasmático de H-2K de ratón endógeno que, tras su traducción, conduce a la formación de una proteína MHC de clase I quimérica humana/de ratón. El casete de selección presente en la construcción de direccionamiento puede retirarse posteriormente usando diversos métodos conocidos en la técnica.

El ADN de BAC dirigido se usó para electroporar células ES F1 H4 de ratón para crear células Es modificadas para generar ratones que expresan una proteína MHC de clase I quimérica sobre la superficie de células nucleadas (por ejemplo, linfocitos T y B, macrófagos, neutrófilos) (véase, por ejemplo, la etapa 1 en el esquema representado en la **FIG. 3A**). Se identificaron células ES que contenían una inserción de secuencias de HLA humano mediante un ensayo TAQMAN™ cuantitativo (Valenzuela *et al.* (2003), *citado anteriormente*).

Para generar ratones que expresan MHC I quimérico, se usan células ES dirigidas descritas anteriormente como células ES donantes y se introducen en un embrión de ratón en la fase de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. n.º 7.294.754 y Poueymirou *et al.* (2007) los ratones

de la generación F0 que esencialmente derivaron totalmente de las células ES dirigidas al gen donante lo que permite los análisis fenotípicos inmediatos Nature Biotech. 25(1):91-99). Se identifican VELOCIMICE® (ratones F0 totalmente derivados de la célula ES donante) que portan independientemente un gen del MHC de clase I quimérico mediante genotipado usando un ensayo de modificación de alelo (Valenzuela *et al.*, citado anteriormente) que detecta la presencia de las secuencias de gen HLA-A\*0201 humanas únicas. Los ratones heterocigotos generados mediante este método se reproducen hasta alcanzar la homocigosis. La expresión de HLA-A2/H-2K quimérico se confirma mediante citometría de flujo usando anticuerpos específicos para HLA-A y H-2K.

Se usaron células ES dirigidas descritas anteriormente que comprenden los loci de HLA-A2/H-2K quiméricos en etapas adicionales de ingeniería genética descritas en los Ejemplos 1.2-1.3 para generar ratones que comprenden loci de MHC I y MHC II humanizados y que carecen de loci de MHC I y MHC II endógenos (Véase la **FIG. 3A**).

*Ejemplo 1.2: Generación de células ES de ratón que comprenden supresiones de loci de MHC I y MHC II*

La supresión de loci del MHC II endógenos se describe en la solicitud de patente de los EE.UU. n.º 20130111616. Brevemente, se preparó el vector de direccionamiento para introducir una supresión de los genes H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2 y H-2Ea del MHC de clase II endógenos usando la tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. n.º 6.586.251 y Valenzuela *et al.*, citado anteriormente). Se modificó el ADN del cromosoma artificial bacteriano (BAC) RP23-458i22 (Invitrogen) para suprimir los genes H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2 y H-2Ea del MHC de clase II endógeno.

Específicamente, los brazos de homología en la dirección 5' y en la dirección 3' se derivaron mediante la PCR del ADN del BAC de ratón a partir de las ubicaciones en 5' del gen de H-2Ab1 y 3' del gen de H-2Ea, respectivamente. Estos brazos de homología se usaron para generar un casete que suprimió ~79 kb de RP23-458i22 que comprendía los genes H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2 y H-2Ea del locus del MHC de clase II mediante recombinación homóloga bacteriana (BHR, por sus siglas en inglés). Esta región se reemplazó por un casete de neomicina flanqueado por sitios lox2372. El vector de direccionamiento final de 5' a 3' incluyó un brazo de homología de 26 kb que comprendía la secuencia 5' genómica de ratón en el gen de H-2Ab1 del locus del MHC de clase II endógeno, un sitio 5' lox2372, un casete de neomicina, un sitio 3' lox2372 y un brazo de homología de 63 kb que comprendía la secuencia 3' genómica de ratón en el gen de H-2Ea del locus del MHC de clase II endógeno.

El vector de direccionamiento de ADN de BAC (descrito anteriormente) se usó para electroporar células ES de ratón que comprendían el locus del MHC I humanizado (del Ejemplo 1.1 anterior; véanse, por ejemplo, la etapa 2 en la **FIG. 3A**) para crear células ES modificadas que comprendían una supresión del locus del MHC de clase II endógeno (se suprimieron tanto H-2A como H-2E). Las células ES positivas que contenían un locus del MHC de clase II endógeno suprimido se identificaron mediante el ensayo de PCR cuantitativa usando sondas TAQMAN™ (Lie y Petropoulos (1998) Curr. Opin. Biotechnology 9:43-48). La región en la dirección 5' del locus suprimido se confirmó mediante PCR usando los cebadores 5111U F (CAGAACGCCAGGCTGTAAC; SEQ ID NO: 1) y 5111U R (GGAGAGCAGGGTCAGTCAAC; SEQ ID NO: 2) y la sonda 5111U P (CACCGCCACTCACAGCTCCTTACA; SEQ ID NO: 3), mientras que la región en la dirección 3' del locus suprimido se confirmó usando los cebadores 5111D F (GTGGGCACCATCTTCATCATTC; SEQ ID NO: 4) y 5111D R (CTTCCTTTCCAGGGTGTGACTC; SEQ ID NO: 5) y la sonda 5111D P (AGGCCTGCGATCAGGTGGCACCT; SEQ ID NO: 6). Se confirmó la presencia del casete de neomicina procedente del vector director usando los cebadores NEOF (TGCGGCCGATCTTAGCC; SEQ ID NO: 7) y NEOR (GAACACGGGCGGCATCAG; SEQ ID NO: 8) y la sonda NEOP (TGGGCACAACAGACAATCGGCTG; SEQ ID NO: 9). La secuencia de nucleótidos a través del punto de supresión en dirección 5' (SEQ ID NO: 10) incluyó lo siguiente, que indica la secuencia endógena de ratón en la dirección 5' del punto de supresión (contenida en los paréntesis a continuación) unida de forma contigua a la secuencia del casete presente en el punto de supresión: (TTTGTAACA AAGTCTACCC AGAGACAGAT GACAGACTTC AGCTCCAATG CTGATTGGTT CCTCACTTGG GACCAACCCT) ACCGGTATAA CTTCGTATAA GGTATCCTAT ACGAAGTTAT ATGCATGGCC TCCGCGCCGG. La secuencia de nucleótidos a través del punto de supresión en la dirección 3' (SEQ ID NO: 11) incluyó lo siguiente, que indica la secuencia del casete contigua de la secuencia endógena de ratón en la dirección 3' del punto de supresión (contenida en los paréntesis siguientes): CGACCTGCAG CCGGCGCGCC ATAACCTCGT ATAAGGTATC CTATACGAAG TTATCTCGAG (CACAGGCATT TGGGTGGGCA GGGATGGACG GTGACTGGGA CAATCGGGAT GGAAGAGCAT AGAATGGGAG TTAGGGAAGA).

Posteriormente a la generación de las células ES que comprendían tanto la humanización del MHC I como la supresión endógena del MHC II descritas anteriormente, el casete de neomicina con lox se eliminó usando CRE (véase, por ejemplo, la etapa 3 en la **FIG. 3A**). Específicamente, se electroporó un plásmido que codificaba la recombinasa Cre en células ES para eliminar el casete de neomicina. El casete Neo también puede eliminarse usando otros métodos conocidos en la técnica.

Para suprimir el locus de H-2D de ratón, se usó BHR para modificar el clon de BAC de ratón bMQ-218H21 (Sanger Institute), reemplazando 3756 pb del gen de H-2-D (desde el codón de inicio ATG hasta 3 pb en dirección 3' del codón de parada TGA, exones 1-8 de H-2D de ratón) con un casete de 6.085 pb que contenía de 5' a 3': un gen LacZ en fase con un sitio loxp 5', el promotor UbC, el gen de neomicina y un sitio loxp 3'.

El vector de direccionamiento de ADN de BAC (descrito anteriormente) se usó para electroporar células ES de ratón que comprendían el locus del MHC I humanizado y una supresión del MHC II de ratón, descrito anteriormente (véase, por ejemplo, la etapa 4 en la **FIG. 3A**). Las células ES positivas que contenían un locus de H-2D endógeno suprimido se identificaron mediante el ensayo de PCR cuantitativa, como se ha descrito anteriormente. La Tabla 2 contiene cebadores y sondas utilizados para el ensayo de PCR cuantitativa.

**Tabla 2: TAQMAN™ Pérdida de cebadores y sondas de ensayo de alelos para la detección del locus de H-2D suprimido**

| Nombre (ubicación)            | Cebador directo                                  | Cebador inverso                                     | Sonda  |
|-------------------------------|--|---|--|
| 5152 mTU<br>(en dirección 5') | CGAGGAGCCCCG<br>GTACA<br><br>(SEQ ID NO:12)      | AAGCGCACGAAGTC<br>CTTGTT<br><br>(SEQ ID NO:13)      | CTCTGTTCGGCTAT<br>GTGG<br><br>(SEQ ID NO:14) |
| 5152 mTD<br>(en dirección 3') | GGACTCCCAGAAT<br>CTCCTGAGA<br><br>(SEQ ID NO:15) | GAGTCATGAACCATC<br>ACTGTGAAGA<br><br>(SEQ ID NO:16) | TGGTGGGTTGCTG<br>GAA<br><br>(SEQ ID NO:17)   |

**Ejemplo 1.3: Introducción del locus del MHC II quimérico humano/de ratón**

Para generar un vector que comprendía HLA-DR2/H-2E humanizado, en primer lugar, se modificó el gen de H-2Ea de ratón de acuerdo con la descripción de la patente de los EE.UU. n.º 8.847.005, concedida el 30 de septiembre de 2014, para generar un vector que comprendía una secuencia que codificaba una proteína H-2Ea/HLA-DRA1\*01 quimérica.

Para el gen de H-2Eb de ratón, se usó la cadena HLA-DR2 β humana sintetizada (DRB1\*1501) para generar un vector que comprendía exones e intrones DRβ1\*02(1501), y se intercambió usando recombinación homóloga bacteriana en el vector que comprendía la proteína quimérica H-2Ea/HLA-DRA1\*01. El gen de H-2Eb1 se modificó esencialmente como se describe en la publicación de patente de los EE.UU. n.º 20130185820 y en la patente de los EE.UU. n.º 8.847.005.

El vector de direccionamiento grande HLA-DR2/H-2E resultante (LTVEC, por sus siglas en inglés) se representa en las **FIG. 2B** y **3B**. Las diversas uniones de secuencia de nucleótidos de los LTVEC resultantes (por ejemplo, uniones de secuencia de ratón/humana, uniones de secuencia humana/de ratón, o uniones de secuencia de ratón o humana con casetes de selección) se resumen a continuación en la Tabla 3 y se enumeran en el Listado de Secuencias; sus ubicaciones se indican en el diagrama esquemático de la **FIG. 3B**. En la Tabla 3 a continuación, a excepción de las secuencias marcadas con asteriscos (\*, véase leyenda de la Tabla) las secuencias de ratón están en fuente normal; las secuencias humanas están entre paréntesis; las secuencias de Lox están en cursiva; y los sitios de restricción introducidos durante las etapas de clonación y otras secuencias basadas en vectores (por ejemplo, sitios de clonación múltiples, etc.) están en negrita.

**Tabla 3: Uniones de secuencia de nucleótidos del locus de HLA-DR2/H-2E quimérico**

| SEQ ID NO: | Secuencia de nucleótidos   |
|------------|--|
| 18         | CTGTTTCTTC CCTAACTCCC ATTCTATGCT CTTCATCCC GA <b>CCGCGG</b> (CCCA<br>ATCTCTCTCC ACTACTTCCT GCCTACATGT ATGTAGGT)    |
| 19         | CTGTTTCTTC CCTAACTCCC ATTCTATGCT CTTCATCCC GA <b>CCGCGG</b> (CCCA<br>ATCTCTCTCC ACTACTTCCT GCCTACATGT ATGTAGGT)    |
| 20*        | (GAAAGCAGTC TTCCCAGCCT TCACACTCAG AGGTACAAAT) CCCATTTC<br>ATATTAGCGA TTTTAATTTA TTCTAGCCTC                         |
| 21*        | TCTTCCCTAA CTCCATTCT ATGCTCTTCC ATCCCGA <b>CCG CGG</b> (CCCAATC<br>TCTCTCCACT ACTTCTGCC TACATGTATG)                |
| 22         | GAGTTCCTCCATCACTTCACTGGGTAGCACAGCTGTAAGTGTCCAGCCTG<br>(TCTGGGCTGCAGGTGGTGGGCGTTGCGGGTGGGGCCGGTTAAGTTCCA)           |
| 23         | (TCCACATCCTATTTTAATTTGCTCCATGTTCTCATCTCCATCAGCACAG)<br><b>CTCGAG ATAAGTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT ATGCATGGCC</b> |

| SEQ ID NO:   | Secuencia de nucleótidos   |
|--|--|
| 24   | ATACGAAGTTAT GCTAGTAACATAACGGTCCTAAGGTAGCGAGTGGCTT<br>ACAGGTAGGTGCGTGAAGCTTCTACAAGCACAGTTGCCCCCTGGGAAGCA |
| Las secuencias marcadas con un asterisco son secuencias de unión C57BL/6-BALB/c donde las secuencias C57BU6 están entre paréntesis. Durante la clonación del gen de H-2Ea quimérico, el exón 1 y el resto del intrón 1 del alelo C57BL/6 de H-2Ea se reemplazaron con la región equivalente de 2616 pb del alelo de BALB/c de H-2Ea. Esto se hizo porque el exón 1 del alelo C57BL/6 de H-2Ea contiene una supresión que vuelve el gen no funcional, mientras que el exón 1 del alelo de BALB/c de H-2Ea es funcional. Para una descripción más detallada, véase la patente de los EE.UU. n.º 8.847.005. |  |

El ADN de BAC dirigido descrito anteriormente se usó para electroporar células ES de ratón que comprendían MHC I humanizado (HLA-A2), así como supresión de MHC II y H-2D para crear células ES modificadas para generar ratones que expresan genes de MHC I y MHC II quiméricos y carecen de loci de H-2E, H-2A, H-2K y H-2D de ratón endógenos funcionales (véase, por ejemplo, la etapa 5 en la **FIG. 3A**). Las células Es que contenían una inserción de secuencias de HLA humanas se identificaron mediante ensayo de PCR cuantitativa (TAQMAN™), usando cebadores y sondas de la Tabla 4.

**Tabla 4: TAQMAN™ Secuencias de cebadores y sondas para la detección de la humanización de los loci de MHC I y MHC II**

| Nombre (ubicación)   | Cebador directo                          | Cebador inverso                            | Sonda   |
|--|--|--|---|
| Casete de hyg  | TGCGGCCGATCTT<br>AGCC (SEQ ID NO:25)     | TTGACCGATTCCTTG<br>CGG (SEQ ID NO:26)      | ACGAGCGGGTTC<br>GGCCCATTC (SEQ ID NO:27)      |
| 7092 hTUP1<br>(Exón 2 de DRB1*1501)  | CCCCACAGCACGT<br>TTCCT (SEQ ID NO:28)    | CGTCCCATTGAAGAA<br>ATGACACT (SEQ ID NO:29) | TGGCAGCCTAAGA<br>GG (SEQ ID NO:30)            |
| 7092 hTUP2<br>(Exón 2 de DRB1*1501)  | CCCCACAGCACGT<br>TTCCT (SEQ ID NO:31)    | ACCCGCTCCGTCCC<br>ATT (SEQ ID NO:32)       | AGCCTAAGAGGG<br>AGTGTC (SEQ ID NO:33)         |
| 7092 hTDP1<br>(Exón 3 de DRB1*1501)  | AGACCCTGGTGAT<br>GCTGGAA (SEQ ID NO:34)  | CGCTTGGGTGCTCC<br>ACTT (SEQ ID NO:35)      | TCGAAGTGGAGA<br>GGTTTA (SEQ ID NO:36)         |
| 7092 hTDP2<br>(exón 3 de DRB1*1501)  | TGGAATGGAGTGA<br>GCAGCTTT (SEQ ID NO:37) | GCACGGTCCCCTTC<br>TTAGTG (SEQ ID NO:38)    | TGACTTCCTAAAT<br>TTCTC (SEQ ID NO:39)         |
| hDRAIU<br>(exón 2 de DRA)  | CTGGCGGCTTGAA<br>GAATTTGG (SEQ ID NO:40) | CATGATTTCCAGGT<br>GGCTTTGTC (SEQ ID NO:41) | CGATTTGCCAGCT<br>TTGAGGCTCAAGG (SEQ ID NO:42) |
| 1751jxn2 <sup>1</sup><br>(ensayo de pérdida de alelo, secuencia presente en la supresión de H-2A y H-2E solamente) | CCTCACTTGGGAC<br>CAACCTA (SEQ ID NO:43)  | TTGTCCAGTCACCG<br>TCCAT (SEQ ID NO:44)     | TGCATCTCGAGCA<br>CAGGCATTGG (SEQ ID NO:45)    |
| <sup>1</sup> Todas las secuencias excepto esta se usan en el ensayo de ganancia de alelo.                          |  |  |   |

El casete de selección puede retirarse mediante métodos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, las células ES que portan los loci del MHC de clase I y de clase II quiméricos humanos/de ratón pueden transfectarse con una construcción que expresa Cre para eliminar los casetes de higromicina y neomicina con "/ox" introducidos mediante la inserción de las construcciones de direccionamiento (véase, por ejemplo, la etapa 6 en la **FIG. 3A**). El casete de selección puede eliminarse opcionalmente reproduciéndolo en ratones que expresan Cre recombinasa. Opcionalmente, se conserva el casete de selección en los ratones.

Las células ES dirigidas que contenían todas las modificaciones descritas en el presente documento (HLA-A2/H-2K, HLA-DR2/H-2E, H-2A-del, H-2D-del de **FIG. 3A**) se verificaron usando un ensayo TAQMAN cuantitativo<sup>®</sup> descrito anteriormente usando los conjuntos de cebador/sonda descritos en el presente documento para modificaciones individuales. Se usó un conjunto de cebador/sonda adicional para determinar que durante la etapa de supresión del casete, no se creó ningún clon invertido debido a que los sitios lox estaban presentes en orientación opuesta.

Las células ES dirigidas descritas anteriormente se utilizaron como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en la fase de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE<sup>®</sup> (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. n.º 7.294.754 y Poueymirou *et al.* (2007), citado anteriormente). Se identificaron VELOCIMICE<sup>®</sup> (ratones F0 totalmente derivados de la célula ES donante) que portaban independientemente genes del MHC de clase I y del MHC de clase II quiméricos mediante genotipado usando un ensayo de modificación de alelo (Valenzuela *et al.*, citado anteriormente) que detecta la presencia de las secuencias génicas humanas únicas. En la **FIG. 3C** se muestra una representación esquemática del genotipo de los loci del MHC en los ratones resultantes (\*\* representa el gen de H-2L que no está presente en todas las cepas de ratón). La expresión de las proteínas MHC I y MHC II quiméricas humanas/de ratón se confirma usando anticuerpos específicos para HLA-DR2 y HLA-A2 humanos. Los ratones heterocigotos se reprodujeron hasta alcanzar la homocigosis.

#### **Ejemplo 1.4: Generación de ratones de $\beta 2$ Microglobulina humanizada**

La generación de ratones con  $\beta 2$  microglobulina se describió en la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. n.º 20130111617. Brevemente, el gen de la  $\beta 2$  microglobulina ( $\beta 2m$ ) de ratón se humanizó en una única etapa mediante la construcción de un único vector de direccionamiento a partir de ADN (BAC) de cromosoma artificial bacteriano humano y de ratón usando la tecnología VELOCIGENE<sup>®</sup> (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. n.º 6.586.251 y Valenzuela *et al.*, citado anteriormente).

Específicamente, se generó un vector de direccionamiento mediante recombinación homóloga bacteriana que contenía brazos de homología de  $\beta 2m$  de ratón en dirección 5' y en dirección 3' del clon de BAC 89C24 de la biblioteca RPCI-23 (Invitrogen). Los brazos de homología de ratón se modificaron por ingeniería genética para flanquear un fragmento de ADN de  $\beta 2m$  humana de 2,8 kb que se extendía del exón 2 a aproximadamente 267 nucleótidos en dirección 3' del exón 4 no codificante (**FIG. 2C**). Se modificó por ingeniería un casete de selección de fármacos (neomicina) flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinasas (por ejemplo, sitios loxP) en el vector de direccionamiento para permitir la selección posterior. El vector de direccionamiento final se linealizó y se electroporó en una estirpe de células ES F1H4 de ratón (Valenzuela *et al.*, citado anteriormente).

Los clones de células ES dirigidas con el casete de fármacos eliminado (mediante la introducción de la Cre recombinasa) se introdujeron en un embrión de ratón en fase de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE<sup>®</sup> (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 7.294.754 y Poueymirou *et al.*, citado anteriormente). Se identificaron VELOCIMICE<sup>®</sup> (ratones F0 totalmente derivados de la célula ES donante) que portaban el gen  $\beta 2m$  humanizado por cribado de la pérdida de alelo de ratón y la ganancia de alelo humano usando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela *et al.*, citado anteriormente). Los ratones heterocigotos se reprodujeron hasta alcanzar la homocigosis. La expresión de la  $\beta 2$  microglobulina humana se confirmó mediante citometría de flujo usando anticuerpos específicos para  $\beta 2$  microglobulina humana.

#### **Ejemplo 2: Generación de ratones receptores de linfocitos T humanizados**

Se generan ratones que comprenden una supresión de loci variables del TCR endógeno (ex o  $\beta$ ) y un reemplazo de segmentos V y J o V, D y J usando la tecnología VELOCIGENE<sup>®</sup> de ingeniería genética (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. n.º 6.586.251 y Valenzuela, D.M., *et al.* (2003), citado anteriormente), en donde se usan secuencias humanas derivadas de bibliotecas de BAC que usan recombinación homóloga bacteriana para crear vectores de direccionamiento grandes (LTVEC) que comprenden fragmentos genómicos de loci variables del TCR humano flanqueados por brazos de direccionamiento para dirigir los LTVEC a loci variables del TCR de ratón endógenos en células ES de ratón. La descripción detallada de la humanización de los loci del TCR alfa y beta se describe en la patente de los EE.UU. n.º 9.113.616. Los LTVEC se volvieron a linealizar y se electroporaron en una estirpe de células ES de ratón de acuerdo con Valenzuela *et al.* Las células ES se seleccionan por su resistencia a higromicina o neomicina y se analizan en busca de pérdida del alelo de ratón o ganancia de alelo humano.

Los clones de células ES dirigidos se introducen en embriones de ratón en fase de 8 células (o antes) mediante el método VELOCIMOUSE<sup>®</sup> (Poueymirou, W.T. *et al.* (2007, citado anteriormente). Se identifican VELOCIMICE<sup>®</sup> (ratones F0 totalmente derivados de la célula ES donante) que portan loci del TCR humanizados por cribado de la pérdida de alelo variable del TCR endógeno y la ganancia de alelo humano usando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela *et al.*, citado anteriormente). Los cachorros F0 se genotipan y se reproducen hasta alcanzar la homocigosis. Se generan ratones homocigotos para loci variables del TCR $\alpha$  y/o TCR $\beta$  humanizados como se describe en el presente documento.



*Ejemplo 2.1: Humanización del locus del TCR  $\alpha$* 

Se reemplazaron 1,5 megabases de ADN en el locus del TCR $\alpha$  de ratón correspondiente a segmentos de ratón 110 V y 60 J con 1 megabase de ADN correspondiente a segmentos 54V y 61J del TCR $\alpha$  humano usando una estrategia de humanización progresiva resumida en la **FIG. 4A** y descrita en la patente de los EE.UU. n.º 9.113.616. Las secuencias de ácido nucleico de unión de diversos vectores de direccionamiento utilizados para la estrategia de humanización progresiva del locus del TCR $\alpha$  se resumen en la Tabla 5 y se incluyen en el Listado de secuencias.

**Tabla 5: Secuencias de ácidos nucleicos de unión para diversos vectores de direccionamiento del locus del TCR $\alpha$**

| MAID N.º   | SEQ ID NO | Descripción   |
|--|-----------|---|
| 1626   | 46        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la secuencia de ratón en dirección 5' del locus variable del TCR $\alpha$ y el extremo 5' del casete <i>loxP-Ub-Hyg-loxP</i> .  |
|  | 47        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' del casete <i>loxP-Ub-Hyg-loxP</i> y el extremo 5' de la inserción TCRV $\alpha$ 40-TCRV $\alpha$ 41-TCRJ $\alpha$ 1 humana, incluyendo el sitio AsiSI.                          |
|  | 48        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la inserción de TCRV $\alpha$ 40-TCRV $\alpha$ 41-TCRJ $\alpha$ 1 humano y el extremo 5' de la secuencia de ratón en dirección 3' del locus variable del TCR $\alpha$ humano, |
|  |           | incluyendo el sitio NotI.   |
| 1767   | 49        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la secuencia de ratón en dirección 5' del locus variable del TCR $\alpha$ y el extremo 5' del casete <i>loxP-Ub-Neo-loxP</i> .  |
|  | 50        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' del casete <i>loxP-Ub-Neo-loxP</i> y el extremo 5' de la inserción TCRV $\alpha$ 35-TCRV $\alpha$ 39 humana, incluyendo el sitio AsiSI.  |
| 1979   | 51        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la secuencia de ratón en dirección 5' del locus variable del TCR $\alpha$ y el extremo 5' del casete <i>frt-Pgk-Hyg-frt</i> .   |
|  | 52        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' del casete <i>frt-Pgk-Hyg-frt</i> y el extremo 5' de la inserción TCRV $\alpha$ 22-TCRV $\alpha$ 34 humana, incluyendo el sitio AsiSI.   |
| 1769   | 53        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la secuencia de ratón en dirección 5' del locus variable del TCR $\alpha$ y el extremo 5' del casete <i>loxP-Ub-Neo-loxP</i> .  |
|  | 54        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' del casete <i>loxP-Ub-Neo-loxP</i> y el extremo 5' de la inserción TCRV $\alpha$ 13-2-TCRV $\alpha$ 21 humana, incluyendo el sitio AsiSI.  |
| 1770   | 55        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la secuencia de ratón en dirección 5' del locus variable del TCR $\alpha$ y el extremo 5' del casete <i>loxP-Ub-Hyg-loxP</i> .  |
|  | 56        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' del casete <i>loxP-Ub-Hyg-loxP</i> y el extremo 5' de la inserción TCRV $\alpha$ 6-TCRV $\alpha$ 8-5 humana, incluyendo el sitio AsiSI.  |
| 1771   | 57        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la secuencia de ratón en dirección 5' y el locus variable del TCR $\alpha$ y al extremo 5' del casete <i>loxP-Ub-Neo-loxP</i> .   |
|  | 58        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' del casete <i>loxP-Ub-Neo-loxP</i> y el extremo 5' de la inserción TCRV $\alpha$ 1-1-TCRV $\alpha$ 5 humana, incluyendo el sitio AsiSI.  |
| Los segmentos de la región variable del TCR $\alpha$ humano están numerados como en la base de datos IMGT. En el listado de secuencias se incluyen al menos 100 pb en cada unión (aproximadamente 50 pb desde cada extremo). |           |   |

- 10 En primer lugar, se modificó el ADN del clon de BAC de ratón RP23-6A14 (Invitrogen) mediante recombinación homóloga y se usó como vector de direccionamiento para reemplazar la región TCRAJ1-TCRAJ28 del locus del TCR $\alpha$  endógeno de ratón con un casete de Ub-higromicina seguido de un sitio *loxP*. Se modificó el ADN del clon de BAC de ratón RP23-117i19 (Invitrogen) mediante recombinación homóloga y se usó como vector de direccionamiento para reemplazar la región de -15 kb que rodea (e incluye) TCRAV1 del locus del TCR $\alpha$  y  $\delta$  de ratón endógeno con un casete de PGK-neomicina seguido de un sitio *loxP*. Las células ES que portan un cromosoma de doble diana (es decir, un único locus del TCR $\alpha$  de ratón endógeno dirigido a ambos vectores de direccionamiento) se confirmaron mediante cariotipado y métodos de detección (por ejemplo, TAQMAN™) conocidos en la técnica. Las células ES modificadas se trataron con CRE recombinasa, mediando de este modo en la supresión de la región entre los dos sitios *loxP* (es decir, la región que consiste en el locus del TCR $\alpha$  de ratón endógeno de TCRAV1 a TCRAJ1) y dejando atrás solamente un
- 15

único sitio *loxP*, casete de neomicina y las regiones constante y potenciadora del ratón. Esta estrategia dio como resultado la generación de un locus  $\alpha/\delta$  del TCR de ratón suprimido (MAID 1540, **FIG. 4A**, segundo diagrama).

El primer vector de direccionamiento humano para TCR $\alpha$  tenía 191.660 pb de ADN humano de los clones de BAC CTD2216p1 y CTD2285m07 (Invitrogen) que contenían los dos primeros segmentos consecutivos del gen del TCR $\alpha$  V humano (TRAV40 y 41) y 61 segmentos del gen del TCR $\alpha$ J (50 funcionales). Este BAC se modificó mediante recombinación homóloga para contener un sitio NotI 403 pb en dirección 3' (3') del segmento del gen del TCR $\alpha$ J1 para la ligadura de un brazo de homología de ratón 3' y un sitio AsiSI 5' para la ligadura de un brazo de homología de ratón 5'. Se usaron dos brazos de homología diferentes para la ligadura de este fragmento humano: el brazo de homología 3' contenía secuencias del TCR $\alpha$  de ratón endógenas del clon de BAC RP23-6A14 y el brazo de homología 5' contenía una secuencia del TCR $\alpha$  endógena 5' del TCR $\alpha$ V de ratón del clon de BAC de ratón RP23-117i19. Este BAC quimérico de ratón-humano se usó como vector de direccionamiento (MAID 1626) para realizar una inserción inicial de segmentos del gen del TCR $\alpha$  humano más un casete en dirección 5' *loxP*-ub-hygromycin-*loxP* en los loci del TCR $\alpha$  de ratón. Las secuencias de ácido nucleico de unión (SEQ ID NO: 46-48) para el vector de direccionamiento MAID 1626 se describen en la Tabla 5.

Posteriormente, se crearon una serie de vectores de direccionamiento humanos que utilizaban el mismo brazo 5' de ratón que contenía la secuencia endógena del TCR $\alpha$  5' del TCR $\alpha$ V de ratón del clon de BAC de ratón RP23-117i19 con alternancia de los casetes de selección *loxP*-neomicina-*loxP* y *loxP*-higromicina-*loxP* (o *frt*-higromicina-*frt* para MAID 1979). Las construcciones específicas se describen en la patente de los EE.UU. n.º 9.113.616, así como se representan en la **FIG. 4A**, con secuencias de unión para cada inserción incluidas en la Tabla 5 y el Listado de secuencias. El locus del TCR $\alpha$  final contenía un casete 5' *loxP*-ub-neomicina-*loxP* más un total de 54 segmentos del gen TCR $\alpha$ V humano (45 funcionales) y 61 segmentos del gen TCR $\alpha$ J humano unidos operativamente a genes constantes y potenciadores del TCR $\alpha$  de ratón. Las secuencias de ácido nucleico de unión (SEQ ID NO: 57 y 58) para el vector de direccionamiento MAID 1771 se describen en la Tabla 5.

En cualquiera de las etapas progresivas de humanización, los casetes de selección se eliminan mediante supresión con recombinasa Cre o Flp. Además, el locus del TCR $\delta$  humano puede reintroducirse en la secuencia del TCR alfa.

#### Ejemplo 2.2: Humanización del locus variable del TCR $\beta$

Se reemplazaron 0,6 megabases de ADN en el locus del TCR $\beta$  de ratón correspondientes a los segmentos de ratón 33 V, 2 D y 14 J con 0,6 megabases de ADN correspondientes a los segmentos 67 V, 2D y 14 J del TCR $\beta$  humano usando una estrategia de humanización progresiva resumida en la **FIG. 4B** y se describe en detalle en la patente de los EE.UU. n.º 9.113.616. Las secuencias de ácido nucleico de unión de diversos vectores de direccionamiento utilizados para la estrategia de humanización progresiva del locus del TCR $\beta$  se resumen en la Tabla 6 y se incluyen en el Listado de secuencias.

**Tabla 6: Secuencias de ácidos nucleicos de unión para diversos vectores de direccionamiento del locus del TCR $\beta$**

| MAID N.º | SEQ ID NO | Descripción   |
|----------|-----------|---|
| 1625     | 59        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la  |
|          |           | secuencia de ratón en dirección 5' del locus variable del TCR $\beta$ (cerca de los genes de tripsinógeno de ratón en dirección 5') y el extremo 5' del casete <i>frt</i> -Ub-Neo- <i>frt</i> .   |
|          | 60        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' del casete <i>frt</i> -Ub-Neo- <i>frt</i> y el extremo 5' de la inserción TCRV $\beta$ 18-TCRV $\beta$ 29-1 humana.  |
|          | 61        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la inserción de TCRV $\beta$ 18-TCRV $\beta$ 29-1 humano y el extremo 5' de la secuencia de ratón en dirección 3' de los segmentos del TCRV $\beta$ de ratón (genes de tripsinógeno de ratón cercanos en dirección 3'). |
| 1715     | 62        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre 3' de los genes de tripsinógeno de ratón en dirección 3' y el extremo 5' de la inserción TCRD $\beta$ 1-TCRJ $\beta$ 1-1-TCRJ $\beta$ 1-6 humana, incluyendo el sitio de Icel.   |
|          | 63        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la inserción TCRD $\beta$ 1-TCRJ $\beta$ 1-1-TCRJ $\beta$ 1-6 humana y el extremo 5' del casete <i>loxP</i> -Ub-Hyg- <i>loxP</i> .  |
|          | 64        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' del casete <i>loxP</i> -Ub-Hyg- <i>loxP</i> y el extremo 5' de la secuencia de ratón cerca del gen C $\beta$ 1 de ratón.   |
|          | 65        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la secuencia de ratón cerca del gen C $\beta$ 1 de ratón y el extremo 5' de la inserción TCRD $\beta$ 2-TCRJ $\beta$ 2-1-TCRJ $\beta$ 2-7 humana, incluyendo el sitio NotI.   |
|          | 66        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la inserción TCRD $\beta$ 2-TCRJ $\beta$ 2-1-TCRJ $\beta$ 2-7 humana y el extremo 5' de la secuencia de ratón en dirección 3' del locus variable del TCR $\beta$ (cerca de la secuencia de ratón de C $\beta$ 2).       |

| MAID N.º   | SEQ ID NO | Descripción  |
|--|-----------|--|
| 1791   | 67        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la secuencia de ratón en dirección 5' del locus variable del TCRβ (cerca de los genes de tripsinógeno de ratón en dirección 5') y el extremo 5' del casete <i>frt-Ub-Hyg-frt</i> . |
|  | 68        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' del casete <i>frt-Ub-Hyg-frt</i> y el extremo 5' de la inserción TCRVβ6-5-TCRVβ17 humana.   |
| 1792   | 69        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la secuencia de ratón en dirección 5' del locus variable del TCRβ (cerca de los genes de tripsinógeno de ratón en dirección 5') y el extremo 5' del casete <i>frt-Ub-Neo-frt</i> . |
|  | 70        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' del casete <i>frt-Ub-Hyg-frt</i> y el extremo 5' de la inserción TCRVβ1-TCRVβ12-2 humana.   |
| 6192   | 71        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre el extremo 3' de la secuencia de ratón cerca del gen Cβ2 de ratón y el extremo 5' de la secuencia del exón 2 de TCRBV30 humano.   |
|  | 72        | Secuencia de ácido nucleico de unión entre la secuencia del exón 1 del TCRBV30 humano del extremo 3' y el extremo 5' de la secuencia de ratón en dirección 3' del locus del TCRβ.  |
| Los segmentos de la región variable del TCRβ humano están numerados como en la base de datos IMGT. En el listado de secuencias se incluyen al menos 100 pb en cada unión (aproximadamente 50 pb desde cada extremo). |           |  |

Específicamente, se modificó el ADN del clon de BAC de ratón RP23-153p19 (Invitrogen) mediante recombinación homóloga y se usó como vector de direccionamiento para reemplazar la región de 17 kb (incluyendo TCRBV30) justo en dirección 5' del grupo de genes de tripsinógeno (TRY) 3' en el locus del TCRβ endógeno de ratón con un casete PGK-neo seguido de un sitio *loxP*. Se modificó el ADN del clon de BAC de ratón RP23-461h15 (Invitrogen) mediante recombinación homóloga y se usó como vector de direccionamiento para reemplazar la región de 8355 pb (incluyendo TCRBV2 y TCRBV3) en dirección 3' del grupo de genes 5' de tripsinógeno (TRY) en el locus del TCRβ endógeno de ratón con un casete Ub-higromicina seguido de un sitio *loxP*. Las células ES que portan un cromosoma de doble diana (es decir, un único locus del TCRβ endógeno de ratón dirigido a ambos vectores de direccionamiento) se confirmaron mediante cariotipado y métodos de detección (por ejemplo, TAQMAN™) conocidos en la técnica. Las células ES modificadas se trataron con CRE recombinasa, mediando en la supresión de la región entre los sitios *loxP* 5' y 3' (que consisten en el locus del TCRβ de ratón endógeno de TCRBV2 a TCRBV30) y dejando solamente un único sitio *loxP*, casete de higromicina y las secuencias TCRBD, TCRBJ, constantes y potenciadoras de ratón. Un TCRVβ de ratón se dejó en dirección 5' del grupo 5' de genes de tripsinógeno, y un TCRVβ de ratón se dejó en dirección 3' del Eβ de ratón, como se indica en la **Fig 4B**.

El primer vector de direccionamiento humano para TCRβ tenía 125.781 pb de ADN humano del clon de BAC CTD2559j2 (Invitrogen) que contenía los primeros 14 segmentos consecutivos del gen del TCRβV humano (TRBV18-TRBV29-1); las secuencias de ácido nucleico de unión (SEQ ID NO: 59-61) para el vector de direccionamiento MAID 1625 se describen en la Tabla 6.

Con el fin de reemplazar los segmentos D y J del TCRβ de ratón con los segmentos D y J del TCRβ humano, se modificó el ADN del clon de BAC de ratón RP23-302p18 (Invitrogen) y del clon de BAC humano RP11-701D14 (Invitrogen) mediante recombinación homóloga y se usó como vector de direccionamiento (MAID 1715) en las células ES que contenían el minilocus del TCRβV descrito anteriormente. (es decir, MAID 1625). Esta modificación reemplazó la región -18540 pb (desde 100 pb en dirección 3' del políA de los genes de tripsinógeno 3' a 100 pb en dirección 3' de los segmentos J en el grupo D2 que incluía TCRBD1-J1 de ratón, la constante 1 de ratón y TCRBD2-J2 de ratón) en el locus del TCRβ endógeno de ratón con -25425 pb de secuencia que contiene TCRBD1-J1 humano, casete *loxP* Ub-higromicina-*loxP*, constante 1 de ratón, TCRBD2-J2 humano. Las células ES que portan un cromosoma de doble diana (es decir, un único locus del TCRβ endógeno de ratón dirigido a ambos vectores de direccionamiento) se confirmaron mediante cariotipado y métodos de detección (por ejemplo, TAQMAN™) conocidos en la técnica. Las células ES modificadas se trataron con recombinasa CRE, mediando de este modo la supresión del casete de higromicina, dejando solamente un único sitio *loxP* en dirección 3' de los segmentos J humanos en el grupo D1J. Las secuencias de ácido nucleico de unión (SEQ ID NO: 62-66) para el vector de direccionamiento MAID 1715 se describen en la Tabla 6.

Posteriormente, se crearon una serie de vectores de direccionamiento humanos que utilizaban el mismo brazo 5' de ratón que contenía una secuencia del TCRβ endógena que rodeaba los genes de tripsinógeno de ratón en dirección 5' del clon de BAC de ratón RP23-461h15 con un casete de selección alternante. Las construcciones específicas se describen en la patente de los EE.UU. nº 9.113.616, así como se representan en la **FIG. 4B**, con secuencias de unión para cada inserción incluidas en la Tabla 6 y el Listado de secuencias.

Por último, se generó un minilocus del TCRβ humano que contenía un total de 66 TCRβV humanos (47 funcionales) y los segmentos D y J del TCRβ humano (MAID 1792) unidos operativamente a genes constantes y potenciadores del TCRβ de ratón. Las secuencias de ácido nucleico de unión (SEQ ID NO: 69 y 70) para el vector de direccionamiento

MAID 1792 se describen en la Tabla 6.

El TCRBV31 de ratón se ubica ~9,4 kb 3' del TCRBC2 (segunda secuencia de la región constante del TCRB) y está en la orientación opuesta a los otros segmentos del TCRBV. El segmento V humano equivalente es TCRBV30, que se ubica en una posición similar en el locus del TCRB humano. Para humanizar TCRBV31, el clon de BAG de ratón que contenía TCRBV31 de ratón, se modificó mediante recombinación homóloga bacteriana para producir LTVEC MAID 6192. Toda la región codificante, comenzando en el codón de inicio en el exón 1, el intrón, la UTR 3' y las secuencias señal de recombinación (RSS) del TCRBV31 se reemplazaron con las secuencias de TCRBV30 humano homólogas. La **FIG. 4B** representa el casete de selección ubicado en el intrón entre el exón 1 y el exón 2 del gen hTCRBV30.

Las secuencias de ácido nucleico de unión (SEQ ID NO: 71 y 72) para el vector de direccionamiento MAID 6192 se describen en la Tabla 6. El ADN de MAID 6192 se electropora en células ES MAID1792 y las células se criban para detectar la pérdida del alelo TCRB31 de ratón y la ganancia del alelo TCRB30 humano.

Se usa una estrategia de ingeniería genética similar para suprimir opcionalmente el segmento del TCR $\beta$  V de ratón 5' restante.

En cualquiera de las etapas anteriores, los casetes de selección se eliminan mediante supresión con recombinasa Cre o Flp.

Se reproducen ratones homocigotos para el locus variable del TCR $\alpha$  humanizado con ratones homocigotos para el locus variable del TCR $\beta$  humanizado para formar una progenie que comprende loci variables de TCR $\alpha$  y TCR $\beta$  humanizados. La progenie se reproduce hasta obtener homocigosidad con respecto a los loci del TCR $\alpha$  humanizado y el TCR $\beta$  humanizado.

Se confirma que los ratones que comprenden loci variables del TCR $\alpha$  y TCR $\beta$  humanizados experimentan un desarrollo normal de linfocitos T y comprenden receptores de linfocitos T que expresan dominios variables derivados de una diversidad de segmentos de genes variables.

### **Ejemplo 3: Humanización de loci de correceptores de linfocitos T**

La humanización de los loci CD4 y CD8 (loci CD8 alfa y CD8 beta) se describe en detalle en la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. n.º 20140245466.

#### **Ejemplo 3. 1: Humanización del locus de CD4**

Específicamente, el locus de CD4 de ratón se humanizó en una única etapa mediante la construcción de un único vector de direccionamiento a partir de ADN (BAC) de cromosoma artificial bacteriano humano y de ratón usando la tecnología VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. n.º 6.586.251 y Valenzuela *et al.* (2003), citado anteriormente). Para generar el vector de direccionamiento, una serie de recombinaciones homólogas bacterianas (BHR) usando ADN de cromosoma artificial bacteriano (BAC), así como otras etapas de ingeniería genética, se realizaron como se describe en detalle en la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. n.º 20140245466.

El vector de direccionamiento de CD4 humano se linealizó con NotI y se electroporó en células ES de ratón F1H4. Las células ES diana que portaban un locus de CD4 humanizado se identificaron mediante genotipado usando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela *et al.*) que detectó la presencia del casete de neomicina y del gen de CD4 humano, así como una copia del gen de CD4 de ratón.

El locus de CD4 humanizado final derivado de la incorporación exitosa del vector dirigido a CD4 humanizado en células ES se representa en la **FIG. 5A**. La secuencia a través de la unión intrón 3 humano - casete lox-neo (extremo 5' del casete) se expone en la SEQ ID NO: 75, y la secuencia a través de la unión casete lox-neo - intrón 3 humano (extremo 3' del casete) se expone en la SEQ ID NO:76; ambas secuencias también se enumeran en la Tabla 7. La secuencia completa de ácidos nucleicos del trozo de CD4 humanizado, incluyendo el casete pgk-neo representado en la **Fig. 5A** se expone en la SEQ ID NO:77. El casete pgk-neo abarca los restos 307-2176 de la SEQ ID NO: 77, los dos sitios lox se ubican en los restos 267-300 y 2182-2215, mientras que la secuencia humana abarca los restos 1-234 y 2222-18263. La secuencia de aminoácidos del polipéptido de CD4 humano se expone en la SEQ ID NO: 78, con la secuencia humana abarcando los aminoácidos 27-319 (expuesta en la SEQ ID NO:79).

Tabla 7. Secuencias de unión del vector de direccionamiento de CD4 quimérico

| Unión   | Secuencia  | SEQ ID NO |
|---|--|-----------|
| Unión ratón 5'/humano   | AGGGGAAACCCGCAAAGGATGGGACATAGGGAGACAGCTGT<br>TAACATCTGAAACATGACCTTCTTTTCTGTGCAGCACAACCTCC<br>TAGCTGTCACTCAAGGG(AAGAAAGTGGTGCTGGGCAAAAAA<br>GGGGATACAGTGGAAGTACCTGTACAGCTTCCCAGAAGAA<br>GAGCATACAATTCCACTGGAAAACTCCAACCAGAT)  | 73        |
| Unión humano 3'/ratón   | (CTGGTCACCTGGATGAAGTGAGGGAGGGCCCTCTGGGTTTG<br>GGGCTGGTTTTGAAGTGAAGATC)ATCTATGTCGGGTGCGGAGAAAG<br>AGGTAATGAAATGGCACATGCTATGTACAACTCTATTGCTG<br>AGCAGCACCCAGTCCTGAGCTGGCTCTGAATTGAGGGTGAA<br>ATTCACACATTCTCCCCAACATCTATAATCTGG | 74        |
| Sitio humano/lox 5'   | (TATGGAGTGAAAGCCTTTGGTGTCTGAGATCTGGTCTTAGT<br>TAAACTCTGGGATC)GGCGCGCCGAATTCCTGCAGCCCGGG<br>CTCGAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATATG<br>CATCCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCC  | 75        |
| Sitio lox 3'/humano   | AGTATTGTTTTGCCAAGTTCTAATTCCATCAGACCTCGACCTG<br>CAGCCCTAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT<br>CCTAGG(CCAGAGGGCTTGGGTTGACAGAACTCAGTGGCAT<br>TCTTATCCAGAGTTTCTCTACACC)   | 76        |
| Las secuencias humanas están entre paréntesis y la secuencia que contiene el sitio de la enzima de restricción (PI-Sce I) está en negrita. Las secuencias del casete de selección están en cursiva. |  |           |

El casete de resistencia a neomicina con flox se elimina mediante electroporación del plásmido que expresa la recombinasa Cre en células ES que contienen locus de CD4 humanizado.

5

Las células ES diana que portan un locus de CD4 humanizado sin marcador de resistencia se identifican mediante genotipado que detectó la ausencia del casete de neomicina, la presencia de una copia del gen de CD4 humano y una copia del gen de CD4 de ratón.

- 10 Las células ES dirigidas descritas anteriormente se utilizaron como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en la fase de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. n.º 7.294.754 y Poueymirou *et al.* (2007), citado anteriormente). Se identificaron VELOCIMICE® (ratones F0 totalmente derivados de la célula ES donante) que portaban independientemente un gen de CD4 quimérico mediante genotipado usando un ensayo de modificación de alelo (Valenzuela *et al.*, citado anteriormente) que detecta la presencia de las secuencias del gen CD4 humanas únicas. La expresión de proteínas CD4 humanizadas en la superficie de los linfocitos T se detectó usando anticuerpos anti-CD4 humanos. Se reprodujeron ratones heterocigotos para la proteína CD4 humanizada descrita en el presente documento hasta alcanzar la homocigosidad.

15

### Ejemplo 3.2: Humanización de loci de CD8

20

Los genes de CD8α y CD8β están coubicados en el genoma, por ejemplo, en el cromosoma 6 de ratón, están ubicados a aproximadamente 37 kb de distancia entre sí. Debido a la unión estrecha, se realiza una orientación secuencial, introduciendo en primer lugar un gen, por ejemplo, CD8β, seguido de la introducción del segundo gen, por ejemplo, CD8α. Las etapas detalladas específicas de la humanización se describen en la publicación de solicitud de patente de los EE.UU. n.º 20140245466.

25

Brevemente, el locus de CD8β de ratón se humanizó en una única etapa mediante la construcción de un vector de direccionamiento único a partir de ADN de cromosoma artificial bacteriano (BAC) de ratón usando tecnología VELOCIGENE®. Se modificó ADN de BAC RP23-431M6 mediante BHR para generar un vector de direccionamiento grande (LTVEC), MAID 1737, contener un reemplazo de los exones 2-3 de ratón que codifican el ectodominio CD8 (desde la unión 5' en el intrón 1 hasta la unión 3' en el intrón 3), con secuencias humanas homólogas (FIG. 5B). Se insertó un casete loxp-Ub-Hyg en la unión 3' del intrón 3. La secuencia de nucleótidos en diversas uniones del vector

30

resultante se enumera en la Tabla 8 y se exponen en el Listado de secuencias. La secuencia de aminoácidos de CD8 $\beta$  humana se expone en la SEQ ID NO: 83; con secuencias humanas que abarcan los aminoácidos 15-165 (expuestas en la SEQ ID NO: 84).

5

**Tabla 8. Secuencias de unión del vector de direccionamiento de CD8 $\beta$  quimérico**

| Unión   | Secuencia  | SEQ ID NO |
|---|--|-----------|
| Ratón/humano en el intrón 1   | TGTTTGCCTGTGACATGAACTCATTGTGACACAAA<br>CCACTGTGCTAGGGGGGATCCACTAGTAACGGC<br>CGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCC(TCGCAAGGG<br>CCAGGCATATAAGTACACAATAAACAAATGGCAG<br>CTCTCTCC) | 80        |
| Humano/5' del sitio lox en el intrón 3  | (CCCCTCCTTCCTTCCCCAGGCACTTCCAAGTGTC<br>AACTCTAGAGCCTAT)CGCGGCCGCAACGGTATA<br>ACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT   | 81        |
| 3' del sitio lox/ratón en el intrón 3   | ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGTCG<br>ACGTAGCCTATTTCTCTAGATCCAAAATGATGACA<br>ACAAAAGGTACCTTGTG   | 82        |
| Las secuencias humanas están entre paréntesis, los sitios lox están en cursiva y los sitios de enzimas de restricción, los múltiples sitios de clonación y las secuencias derivadas de vectores están en negrita. |  |           |

El vector de direccionamiento se electroporó en células ES de ratón F1H4. Las células ES diana que portaban un locus de CD8 $\beta$  humanizado se identificaron mediante genotipado usando una modificación del ensayo de alelo (Valenzuela *et al.*) que detectó la presencia del gen de CD8 $\beta$  humano.

10

El locus de CD8 $\alpha$  de ratón también se humanizó en una única etapa mediante la construcción de un vector de direccionamiento único a partir de ADN de cromosoma artificial bacteriano (BAC) de ratón usando tecnología VELOCIGENE<sup>®</sup>. Se modificó ADN de BAC RP23-431M6 mediante BHR para generar un vector de direccionamiento grande (LTVEC), MAID 1738, para contener un reemplazo de los exones 1-2 de ratón que codifican el ectodominio CD8 $\alpha$  (desde la unión 5' en el codón 27 de Ala en el exón 1 del ratón hasta la unión 3' en el intrón 2 del ratón), con las secuencias humanas homólogas (desde la unión 5' unión en el exón 2 humano a la unión 3' en el intrón 3 (**Fig. 5A**)). Esto retiene la secuencia líder del ratón al comienzo del exón 1. Se insertó un casete lox2372-Ub-Neo en la unión 3' de secuencias humana/ratón. Las secuencias de nucleótidos en diversas uniones del vector resultante se enumeran en la Tabla 9 y se exponen en el Listado de secuencias. La secuencia de aminoácidos de CD8 $\alpha$  humana se expone en la SEQ ID NO: 88, con la secuencia humana abarcando los aminoácidos 28-179 (expuesta en la SEQ ID NO:89).

15

20

**Tabla 9. Secuencias de unión del vector de direccionamiento de CD8 $\alpha$  quimérico**

| Unión   | Secuencia   | SEQ ID NO |
|---|---|-----------|
| Ratón/humano en el exón 1 (ratón) y exón 2 (humano)   | TGAACCTGCTGCTGCTGGGTGAGTCGATTATCCTGGGGAGT<br>GGAGAAGCT(AGGCCGAGCCAGTTCCGGGTGTGCGCCGCTGG<br>ATCGGACCTGGAACCTGGG) | 85        |
| Humano/5' del sitio lox 2372  | (ATGCCAGGGACAGCCCTGATACTGTAGGTAGAGTCAAGG<br>GCTGTCCAAGT)ACCGGTATAACTTCGTATAAGGTATCCTAT<br>ACGAAGTTAT            | 86        |
| 3' de sitio lox 2372/ratón  | ATAACTTCGTATAAGGTATCCTATACGAAGTTATCTCGACCTG<br>ATCTTGGAGGGAGACCTGGACCGGGAGACGTGCTGGGGGC<br>AGGGTT               | 87        |
| Las secuencias humanas están entre paréntesis, los sitios lox están en cursiva y los sitios de enzimas de restricción, los múltiples sitios de clonación y las secuencias derivadas de vectores están en negrita. |   |           |

El vector dirigido a CD8 $\alpha$  humanizado descrito anteriormente se electroporó en células ES de ratón que contenían un locus de CD8b humanizado para crear células ES modificadas que comprenden loci de CD8b y CD8a humanizados (**Fig. 5B**). Las células ES diana que portaban loci de CD8a y CD8b humanizados se identificaron mediante genotipado usando una modificación del ensayo de alelo (Valenzuela *et al.*).

Las células ES dirigidas descritas anteriormente se utilizaron como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en la fase de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. n.º 7.294.754 y Poueymirou *et al.*, citado anteriormente). Se identificaron VELOCIMICE® (ratones F0 totalmente derivados de la célula ES donante) que portaban un gen de CD8b quimérico y un gen de CD8a quimérico mediante genotipado usando un ensayo de modificación de alelo (Valenzuela *et al.*, citado anteriormente) que detecta la presencia de las secuencias de los genes CD8b y CD8a humanas únicas.

Los casetes de selección en los loci CD8 $\alpha$  y CD8 $\beta$  pueden eliminarse mediante métodos conocidos por el experto en la materia. Los ratones heterocigotos para los loci CD8 $\alpha$  y CD8 $\beta$  humanizados como se describe en el presente documento se reproducen hasta obtener homocigosidad. La expresión de CD8 $\alpha$  y CD8 $\beta$  humanizados en la superficie de los linfocitos T se detecta usando anticuerpos anti-CD8 humanos.

#### **Ejemplo 4: Generación de ratones que comprenden componentes del sistema inmunitario celular humanizado**

Con el fin de generar ratones que comprendan componentes del sistema inmunitario celular humanizado, pueden reproducirse ratones homocigotos para la humanización de diversos componentes, por ejemplo, MHC I, MHC II  $\alpha$  y  $\beta$ , TCR $\alpha$  y  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\beta$ 2M en cualquier combinación para crear ratones que tengan diferentes componentes de la respuesta inmunitaria de linfocitos T humanizados. Por ejemplo, un ratón que comprende un MHC I humanizado puede reproducirse con un ratón que comprende un  $\beta$ 2M humanizado para generar un ratón que expresa MHC I/ $\beta$ 2M humanizado. Se reproducen ratones homocigotos para la humanización de diversos componentes, por ejemplo, MHC I, MHC II  $\alpha$  y  $\beta$ , TCR $\alpha$  y  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\beta$ 2M usando métodos conocidos en la técnica para obtener un ratón que comprende las nueve humanizaciones (ratones "TM I/II B C4/8"). Los ratones se reproducen hasta alcanzar la homocigosidad usando métodos conocidos en la técnica. Como alternativa, pueden introducirse vectores de direccionamiento que comprenden cada gen humanizado mediante direccionamiento secuencial en la misma célula ES para obtener una célula ES que comprende las nueve humanizaciones, y la célula ES resultante se introduce en un embrión de ratón en fase de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE®, como se ha descrito en los Ejemplos 1-3 anteriores.

#### **Ejemplo 5: Caracterización de ratones que comprenden componentes del sistema inmunitario celular humanizado**

Se caracterizaron ratones homocigotos para MHC I, MHC II  $\alpha$  y  $\beta$ , TCR $\alpha$  y  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  y  $\beta$  y para  $\beta$ 2M humanizado. Específicamente, se recogieron bazo y timo, de ratones y se obtuvieron suspensiones de células individuales. Las suspensiones se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min a 4 °C para sedimentar las células y las células de cada tejido se lisaron con 4 ml de tampón de lisis ACK (GIBCO) para lisar los glóbulos rojos. Las células se filtraron a través de un filtro celular, se centrifugaron para sedimentar, se resuspendieron en medio y se contaron.

La expresión en la superficie celular de CD19, CD3, CD4 y CD8 $\alpha$  representada en las **FIG. 6A-C** y las **FIG. 9A-C** se analizó mediante FACS usando anticuerpos conjugados con fluorocromo: anti-CD3 de ratón (17A2, *BD*), anti-CD19 de ratón (1D3, *BD*), anti-F4/80 de ratón (BM8, *Biolegend*), anti-CD8 $\alpha$  de ratón (53-6.7, *BD*), anti-CD4 de ratón (RM4-5, *eBioscience*), anti-CD8 $\alpha$  humano (SK1, *BD*) y anti-CD4 humano (RPA-T4, *BD*). La expresión en la superficie celular H2Db de ratón, moléculas de HLA humano (HLA-A2, B2m y HLA-DR) y moléculas de MHC I<sup>A</sup>I<sup>E</sup> de ratón en las **FIG. 7A-F** y **10A-F** fue analizado mediante FACS usando anticuerpos conjugados con fluorocromo: anti-CD19 de ratón (6D5, *Biolegend*), anti-F4/80 de ratón (BM8, *Biolegend*), anti-H2Db de ratón (KH95, *Biolegend*), anti-HLA-A2 humano (BB7.2, *BD*), anti-HLA-DR humano (G46-6, *BD*), anti-B2 microglobulina humana (2M2, *Biolegend*) y anti-I<sup>A</sup>I<sup>E</sup> de ratón (M5/114.15.2, *eBioscience*). La expresión en la superficie celular de CD4 y CD8 de ratón y humanos en la **FIG. 7G** y **FIG. 10G** se analizó mediante FACS usando anticuerpos conjugados con fluorocromo: anti-CD3 de ratón (17A2, *Biolegend*), anti-CD4 de ratón (GK1.5, *eBiosciences*), anti-CD8 $\alpha$  de ratón (53-6.7, *BD* 2), anti-CD8 $\beta$  de ratón (H35-17.2, *eBioscience*), anti-CD4 humano (OKT4, *eBioscience*), anti-CD8 $\alpha$  humano (RPA-T8, *BD* 6), anti-CD8 $\beta$  humano (2ST8.5H7, *BD*). La expresión en la superficie celular de FoxP3 y CD25 se muestra en la **FIG. 8** o la **FIG. 11** se analizó mediante FACS anti-FoxP3 (FJK-16s, *eBioscience*) y anti-CD25 (PC61, *Biolegend*). Se analizó la expresión en la superficie celular de CD44 y CD62L que se muestra en las **FIG. 9D-9E** usando anti-CD44 (IM7, *BD*) y anti-CD62L (MEL-14, *Biolegend*).

Se realizó la citometría de flujo usando BD-Fortessa. Los datos se analizaron usando FlowJo.

La expresión en el timo se representa en las **FIG. 6A-C, 7A-G** y **8**. Los números absolutos de timocitos y células CD3+, y el desarrollo general de los linfocitos T tímicos, fueron comparables en ratones de control y ratones TM I/II B C4/8 humanizados (datos no mostrados). La **FIG. 6A** muestra que la proporción de linfocitos B y linfocitos T en el timo de ratones que tienen un sistema inmunitario celular humanizado (TM I/II B C4/8) es similar a la proporción encontrada en ratones control. La frecuencia y el número de células F4/80 en los timos de ratones TM I/II B C4/8 se compararon

con ratones de control (**FIG. 6B** y datos no mostrados). Igualmente, se expresan CD4 y CD8 humanizados en células tímicas de un ratón humanizado para los nueve genes de inmunidad celular (TM I/II B C4/8), similar a la expresión de CD4 y CD8 de ratón en ratones de control no humanizados (**FIG. 6C**). Se expresa  $\beta$ 2M humanizada en la superficie de linfocitos B y macrófagos en ratones TM I/II B C4/8 humanizados, mientras que su expresión está ausente en los linfocitos B y macrófagos de los ratones control (**FIG. 7A y 7B**). De forma similar, los MHC I y II humanizados están presentes en la superficie de los linfocitos B y de los macrófagos de ratones TM I/II B C4/8 humanizados (**FIG. 7C y 7D**) mientras que las moléculas del MHC de clase I y II de ratón eran indetectables (**FIG. 7E y 7F**). Se expresan CD4, CD8  $\alpha$  y CD8 $\beta$  humanizados en la superficie de células tímicas CD3<sup>+</sup> obtenidas de ratones TM I/II B C4/8 humanizados, mientras que están ausentes en las células tímicas CD3<sup>+</sup> en los ratones control (**FIG. 7G**). TM I/II B CD4/8 humanizados expresan linfocitos T reguladores (Treg) (**FIG. 8**), linfocitos NK (CD335<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) y monocitos (CD11b<sup>+</sup>) (datos no mostrados).

La expresión en el bazo se representa en las **FIG. 9A-D**, y **10A-10G**. Los bazos de ratones humanizados para componentes del sistema inmunitario celular (TM I/II B CD4/8) comprendían números absolutos comparables de células CD3<sup>+</sup> y una proporción casi normal de linfocitos B y T (**FIG. 9A** y datos no mostrados). La frecuencia y el número de células F4/80 en los bazos de ratones TM I/II B C4/8 se compararon con ratones de control (**FIG. 9B** y datos no mostrados). Los ratones humanizados para los componentes del sistema inmunitario celular (TM I/II B CD4/8) expresaron CD4 y CD8 $\alpha$  humanizados en células esplénicas CD3<sup>+</sup> (**FIG. 9C**). Los ratones humanizados TM I/II B CD4/8 comprendían linfocitos T efector de memoria (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y linfocitos T de memoria central (CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) CD8<sup>+</sup> (**FIG. 9D y 9E**).

Como se muestra en las **FIG. 10 A y 10B**, se expresa  $\beta$ 2M humanizada en la superficie de linfocitos B y macrófagos en el bazo de ratones TM I/II B C4/B humanizados, mientras que su expresión, y la expresión de moléculas del MHC de ratón, están ausentes de los linfocitos B y los macrófagos en el bazo de los ratones de control. De forma similar, los MHC I y II humanizados están presentes en la superficie de los linfocitos B y de los macrófagos en el bazo de ratones TM I/II B C4/B humanizados (**FIG. 10C y 10D**) mientras que las moléculas del MHC de clase I y II de ratón eran indetectables (**FIG. 10E y 10F**). Se expresan CD4, CD8  $\alpha$  y CD8 $\beta$  humanizados en la superficie de células del bazo CD3<sup>+</sup> obtenidas de ratones TM I/II B C4/8 humanizados, mientras que están ausentes en las células del bazo CD3<sup>+</sup> en los ratones control (**FIG. 10G**). Los ratones TM I/II B C4/8 tienen una expresión casi normal de linfocitos T reguladores esplénicos en comparación con los ratones control (**FIG. 11**), y expresan linfocitos NK esplénicos (CD335<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) y monocitos (CD11b<sup>+</sup>).

#### **Ejemplo 6: Evaluación de la presentación y la activación de linfocitos T con péptido humano**

Para determinar si los ratones que comprenden componentes del sistema inmunitario celular humanizado presentaron respuestas inmunitarias de linfocitos T humanizados, se sometió a ensayo la capacidad de los esplenocitos de ratones humanizados para componentes del sistema inmunitario celular (TM I/II B CD4/8) para presentar y responder a MAGE-A3, un péptido presentado, específicamente, por HLA-A2 humano.

MAGE-A3, un péptido presentado, específicamente, por HLA-A2 humano, se sintetiza (Celtek Biosciences), se diluye en PBS y se mezcla en volumen igual con adyuvante completo de Freund (CFA; Chondrex, Inc.) de manera que 200  $\mu$ g de MAGE-A3 estén contenidos en la emulsión de 200  $\mu$ l. Se inyectan 50  $\mu$ l de emulsión en 4 puntos de cada animal. Dos puntos están cada uno en un flanco trasero y 2 puntos cada uno cerca de cada hombro de ratones homocigotos para MHC I, MHC II  $\alpha$  y  $\beta$ , TCR $\alpha$  y  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  y  $\beta$ , y  $\beta$ 2M (TM I/II B CD4/8) humanizados o ratones de control que expresan MHC I, MHC II  $\alpha$  y  $\beta$ , TCR $\alpha$  y  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  y  $\beta$ , y  $\beta$ 2M endógenos.

Se obtienen y disocian suspensiones de bazo de ratones inmunizados. Los glóbulos rojos se lisan en tampón de lisis ACK (Life Technologies) y los esplenocitos se suspenden en medio completo RPMI. Se someten a ensayo  $2 \times 10^5$  esplenocitos aislados en ausencia o en presencia de péptido MAGE-A3 10  $\mu$ g/ml o 1 pg/ml diluido por pocillo de placas de PVDF (Millipore) recubiertas con 5  $\mu$ g/ml del anticuerpo de captura de IFN- $\gamma$  de ratón (BD Biosciences) en un ensayo ELISPOT. Después de una incubación de 16-20 horas con péptido, las placas se lavan y se incuban con anticuerpo de detección biotinilado (BD Biosciences), se lavan, se tratan con estreptavidina-HRP (MabTech), se lavan y se revelan con sustrato TMB (Mabtech) y se cuentan con un lector AID Elispot.

Aunque solamente se muestra un ratón por genotipo, se sometieron a ensayo varios ratones de cada genotipo y todas las muestras se analizaron por triplicado con la desviación típica mostrada mediante barras de error. Como se muestra en la **FIG. 12**, solamente muestras de ratones homocigotos para cada uno de los MHC I, MHC II  $\alpha$  y  $\beta$ , TCR $\alpha$  y  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  y  $\beta$ , y  $\beta$ 2M (TM I/II B CD4/8) humanizados respondieron secretando IFN- $\gamma$  después del tratamiento con el péptido MAGE-A3 específico de HLA-A2, lo que indica que los linfocitos T de estos ratones se activaron después de la presentación de MAGE-A3 por HLA-A2 humanizado.

#### **Ejemplo 7: Evaluación de la función de los linfocitos T usando el modelo de infección por LCMV**

Para determinar si los ratones que comprenden componentes del sistema inmunitario celular humanizado mostraron una respuesta normal a la infección, se sometió a ensayo la capacidad de los ratones humanizados de clarificar el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV). El LCMV es un virus trópico de ratón, donde el desarrollo de la infección



depende de la cepa vírica. La exposición a la cepa Armstrong da como resultado una infección aguda, donde los ratones pueden desarrollar rápidamente una respuesta de linfocitos T contra el virus y clarificar la infección en aproximadamente una semana. Por otro lado, el virus de clon 13 no se puede aclarar y los linfocitos T se "agotan" (expresando marcadores asociados al agotamiento de los linfocitos T, por ejemplo, PD1, Lag3, Tim3) y se establece una infección crónica. Se ha demostrado que la infección de ratones con CD8 agotado o con deficiencia de MHC de clase I con la cepa Armstrong da como resultado el mantenimiento de títulos víricos elevados (J. Virol. 68:8056-63 (1994)). Por lo tanto, puesto que la infección vírica depende de la actividad de los linfocitos T, el LCMV es un modelo ideal para someter a ensayo la función de los linfocitos T.

Para determinar si los ratones que comprenden componentes del sistema inmunitario celular humanizado, por ejemplo, MHC I, MHC II  $\alpha$  y  $\beta$ , TCR $\alpha$  y  $\beta$ , CD4, CD8 $\alpha$  y  $\beta$ , y  $\beta$ 2M, presentan una función normal de los linfocitos T, tanto los ratones de control como los humanizados (TM I/II B C4/8) se infectaron con  $2 \times 10^5$  ufc de la cepa i.p. del virus Armstrong el Día 0. Los Días 3, 6, 9 y 12, se recogieron los órganos y se midieron los títulos víricos. Como se muestra en la **FIG. 13A**, tanto los ratones control como los humanizados fueron capaces de aclarar la infección por Armstrong.

Tanto los ratones de control como los humanizados también se infectaron con  $4,5 \times 10^5$  ufc del virus Clon 13 i.v. el Día 0 y el Día 21 se recogieron los órganos y se midieron los títulos víricos. Como se muestra en la **FIG. 13B**, ambas cepas de ratón pudieron establecer una infección crónica por LCMV. La capacidad de los ratones humanizados para expresar PD1, Lag3 y Tim3, marcadores de agotamiento de linfocitos T, también se midió. Se extrajo sangre de ratones no infectados y de ratones humanizados infectados 3 semanas después de la infección y se tiñó mediante citometría de flujo con anticuerpo anti-PD1 conjugado con PE-Cy7 (BIOLEGEND), anticuerpo Lag3 conjugado con PerCpCy5.5 (BIOLEGEND) y anticuerpo Tim3 conjugado con PE (R&D Systems). Los datos en la **FIG. 13C** es una cuantificación de células que se tiñen positivamente para los receptores indicados. Tanto los ratones humanizados (TM I/II B C4/8) como los ratones B6 de control expresaron los tres marcadores de agotamiento de linfocitos T 3 semanas después de la infección con la cepa crónica de LCMV Clon 13.

Para evaluar las respuestas de los linfocitos T de memoria en ratones humanizados para los componentes del sistema inmunitario celular, se infectaron 5 ratones de control y 4 humanizados con  $2 \times 10^5$  ufc de la cepa Armstrong, y el día 17 se superinfectaron con  $4,5 \times 10^5$  ufc de cepa Clon 13 (2 de cada ratón humanizado y de control se infectaron de forma simulada como control adicional). El Día 31 después de la infección inicial, se extrajeron órganos y se analizaron los títulos víricos. Como se muestra en la **FIG. 14**, 5/5 ratones de control y 3/4 ratones humanizados que habían encontrado una infección aguda por LCMV estaban protegidos posteriormente de la infección crónica por LCMV, demostrando respuestas de linfocitos T de memoria intactas en estos animales.

Para analizar la naturaleza de las respuestas celulares, los ratones de control y humanizados se infectaron el Día 0 con  $2 \times 10^5$  ufc de la cepa del virus Armstrong. El Día 10 (**FIG. 15A-B**) o en los momentos indicados después de la infección (**FIG. 15C-D**) la especificidad de la respuesta celular se analizó usando tres péptidos restringidos por HLA-A2 que se sabe que activan los linfocitos T CD8<sup>+</sup> humanos (GPC10-18, N69-77 o Z49-58), véase Botten *et al.* (2007) J. Virol. 81:2307-17, o gp33, un péptido de LCMV inmunodominante reconocido por ratones en un fondo H-2D<sup>b</sup>. Específicamente, se aislaron linfocitos T CD8<sup>+</sup> de bazo extirpados y se pulsaron con los péptidos. Las células CD8<sup>+</sup> productoras de interferón- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) se midieron mediante ELISpot (**FIG. 15A-B**) o mediante tinción para IFN $\gamma$  intracelular (**FIG. 15C-D**).

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> aisladas de animales de control son activadas específicamente por el péptido gp33 (**FIG. 15A**), mientras que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> aislados de animales humanizados son activados por los péptidos restringidos por HLA-A2 (**FIG. 15B**). El curso temporal de la activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, según lo controlado por su capacidad para expresar IFN $\gamma$  cuando se estimula con los péptidos, se muestra en ratones control y humanizados. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> se expanden durante las dos primeras semanas después de la infección y son indetectables una vez que se aclara el virus (**FIG. 15C-D**). Aunque la respuesta al péptido gp33 pareció más fuerte en los animales de control, cabe señalar que gp33 es un epítipo de LCMV inmunodominante conocido, mientras que no se ha identificado el epítipo de LCMV inmunodominante restringido por HLA-A2. En conclusión, los animales que comprenden un sistema inmunitario de linfocitos T humanizado o sustancialmente humanizado son capaces de procesar la proteína expresada por LCMV, presentándola en moléculas del MHC humanizadas y activando linfocitos T a través de un receptor de linfocitos T humanizado.

## REIVINDICACIONES

## 1. Un roedor modificado genéticamente, que comprende

- 5 (a) una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del correceptor de CD4 quimérico que comprende la porción extracelular, o una parte de la misma, de un polipéptido del correceptor de CD4 humano y al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del correceptor de CD4 de roedor,
- 10 en donde el polipéptido del correceptor de CD4 quimérico comprende opcionalmente los dominios D1, D2 y D3 del polipéptido del correceptor de CD4 humano, y en donde el roedor expresa el polipéptido del correceptor de CD4 quimérico;
- 15 (b) una segunda secuencia de nucleótidos y una tercera secuencia de nucleótidos que codifican respectivamente un polipéptido del correceptor de CD8 $\alpha$  quimérico y un polipéptido del correceptor de CD8 $\beta$  quimérico,
- 20 en donde el polipéptido del correceptor de CD8 $\alpha$  quimérico comprende la porción extracelular, o una parte de la misma, de un polipéptido del correceptor de CD8 $\alpha$  humano y al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del correceptor de CD8 $\alpha$  de roedor, y en donde el polipéptido del correceptor de CD8 $\alpha$  quimérico comprende opcionalmente el dominio similar a IgV del polipéptido del correceptor de CD8 $\alpha$  humano,
- 25 en donde el polipéptido del correceptor de CD8 $\beta$  quimérico comprende la porción extracelular, o una parte de la misma, de un polipéptido del correceptor de CD8 $\beta$  humano y al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del correceptor de CD8 $\beta$  de roedor, y en donde el polipéptido del correceptor de CD8 $\beta$  quimérico comprende opcionalmente el dominio similar a IgV del polipéptido del correceptor de CD8 $\beta$  humano,
- 30 en donde el roedor expresa un correceptor de CD8 quimérico que comprende el polipéptido del correceptor de CD8 $\alpha$  quimérico y el polipéptido del correceptor de CD8 $\beta$  quimérico;
- 35 (c) una primera secuencia de ácido nucleico y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifican respectivamente un polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico y un polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico,
- 40 en donde el polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico comprende los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de un polipéptido de HLA de clase II  $\alpha$  humano y al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del MHC II  $\alpha$  de roedor,
- 45 en donde el polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico comprende los dominios  $\beta 1$  y  $\beta 2$  de un polipéptido de HLA de clase II  $\beta$  humano y al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del MHC II  $\beta$  de roedor,
- 50 en donde el roedor expresa un complejo MHC II quimérico que comprende el polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico y el polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico, y en donde el complejo MHC II quimérico se asocia al polipéptido del correceptor de CD4 quimérico;
- 55 (d) una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC I quimérico,
- 60 en donde el polipéptido del MHC I quimérico comprende los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de un polipéptido de HLA de clase I humano y al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del MHC I de roedor, y en donde el roedor expresa el polipéptido del MHC I quimérico, y en donde el polipéptido del MHC I quimérico se asocia al correceptor de CD8 quimérico; y
- 65 (e) una secuencia de la región variable  $\alpha$  del receptor de linfocitos T (TCR) sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\alpha$  humano y al menos un segmento J $\alpha$  humano que se reordenan en un linfocito T para formar una secuencia de V $\alpha$ /J $\alpha$  humana reordenada unida operativamente a una secuencia de la región constante del TCR $\alpha$  de roedor, y una secuencia de la región variable del TCR $\beta$  sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\beta$  humano, al menos un segmento D $\beta$  humano y al menos un segmento J $\beta$  humano que se reordenan en un linfocito T para formar una secuencia de V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$  humana reordenada, unida operativamente a una secuencia de la región constante del TCR $\beta$  de roedor,
- en donde la secuencia de V $\alpha$ /J $\alpha$  humana reordenada unida operativamente a una secuencia de la región constante del TCR $\alpha$  de roedor codifica una cadena de TCR $\alpha$  humanizado que comprende un dominio variable del TCR $\alpha$  humano unido operativamente a un dominio constante del TCR $\alpha$  de roedor,
- en donde la secuencia de V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$  humana reordenada unida operativamente a una secuencia de la región constante del TCR $\beta$  de roedor codifica una cadena de TCR $\beta$  humanizado que comprende un dominio variable del TCR $\beta$  humano unido operativamente a un dominio constante del TCR $\beta$  de roedor,
- en donde el roedor expresa un receptor de linfocitos T que comprende una región variable del TCR $\alpha$  humano y/o una región variable del TCR $\beta$  humano en la superficie de un linfocito T; y

(f) un locus de la  $\beta 2$  microglobulina que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la  $\beta 2$  microglobulina humana, en donde el roedor expresa un polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina humano o humanizado.

- 5 2. El roedor modificado genéticamente de la reivindicación 1, en donde el polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del MHC II  $\alpha$  de roedor endógeno, por ejemplo, un polipéptido de H-2E  $\alpha$  murino, y el polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del MHC II  $\beta$  de roedor endógeno, por ejemplo, un polipéptido de H-2E  $\beta$  murino, y/o el polipéptido del MHC I quimérico comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del MHC I de roedor endógeno, por ejemplo, un polipéptido de H-2K murino,

10 en donde el polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico comprende opcionalmente los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de una proteína HLA-DR  $\alpha$  humana, una proteína HLA-DQ  $\alpha$  humana o una proteína HLA-DP  $\alpha$  humana, en donde el polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico comprende opcionalmente los dominios  $\beta 1$  y  $\beta 2$  de una proteína HLA-DR  $\beta$  humana, una proteína HLA-DQ  $\beta$  humana o una proteína HLA-DP  $\beta$  humana, y/o  
15 en donde el polipéptido del MHC I quimérico comprende opcionalmente los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de una proteína HLA-A humana, por ejemplo, los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de un polipéptido de HLA-A2 humano, tal como un polipéptido de HLA-A2.1 humano, una proteína HLA-B humana o una proteína HLA-C humana.

- 20 3. El roedor modificado genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la secuencia de la región variable del TCR $\alpha$  sin reordenar comprende un repertorio completo de segmentos del gen V $\alpha$  humano y un repertorio completo de segmentos del gen J $\alpha$  humano y/o la secuencia de la región variable del TCR $\beta$  sin reordenar comprende un repertorio completo de segmentos del gen V $\beta$  humano, un repertorio completo de segmentos del gen D $\beta$  humano y un repertorio completo de segmentos del gen J $\beta$  humano.

- 25 4. El roedor modificado genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los segmentos V $\alpha$  y J $\alpha$  no humanos endógenos son incapaces de reordenarse para formar una secuencia V $\alpha$ /J $\alpha$  reordenada y/o en donde los segmentos V $\beta$ , D $\beta$ , y J $\beta$  no humanos endógenos son incapaces de reordenarse para formar una secuencia V $\beta$ /D $\beta$ /J $\beta$  reordenada, de manera que el roedor carece de un locus variable del TCR $\alpha$  de roedor endógeno funcional y/o un locus del TCR $\beta$  de roedor endógeno funcional.

- 30 5. El roedor modificado genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el locus variable del TCR $\alpha$  de roedor endógeno carece de segmentos del gen V $\alpha$  endógeno funcional y/o carece de segmentos del gen J $\alpha$  endógeno funcional; y/o  
35 en donde el locus variable del TCR $\beta$  de roedor endógeno (a) carece de segmentos del gen V $\beta$  endógeno funcional, (b) carece de segmentos del gen D $\beta$  endógeno funcional, (c) carece de segmentos del gen J $\beta$  endógeno o (d) cualquier combinación de (a), (b) y (c).

- 40 6. El roedor modificado genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del correceptor de CD4 quimérico está presente en un locus del correceptor de linfocitos T CD4 endógeno, la segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del correceptor de CD8 $\alpha$  quimérico está presente en un locus del correceptor de linfocitos T CD8 $\alpha$  endógeno, y la tercera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del correceptor de CD8 $\beta$  quimérico está presente en un locus del correceptor de linfocitos T CD8 $\beta$  endógeno;  
45 en donde la primera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico está presente en un locus del MHC II  $\alpha$  de roedor endógeno, la segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico está presente en un locus del MHC II  $\beta$  de roedor endógeno y la tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC II quimérico está presente en un locus del MHC I de roedor endógeno;  
50 y/o en donde la secuencia de la región variable del TCR $\alpha$  sin reordenar está presente en un locus de la región variable del TCR $\alpha$  endógeno y la secuencia de la región variable del TCR $\beta$  sin reordenar está presente en un locus de la región variable del TCR $\beta$  endógeno.

- 55 7. El roedor modificado genéticamente de la reivindicación 6, en donde la primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del correceptor de CD4 quimérico se expresa bajo el control regulador de elementos promotores y reguladores de CD4 de roedor endógeno, la segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del correceptor de CD8 $\alpha$  quimérico se expresa bajo el control regulador de elementos promotores y reguladores de CD8 $\alpha$  de roedor endógeno, y la tercera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del correceptor de CD8 $\beta$  quimérico se expresa bajo el control regulador de elementos promotores y reguladores de CD8 $\beta$  de roedor endógeno;

60 en donde la primera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico se expresa bajo el control regulador de elementos promotores y reguladores del MHC II  $\alpha$  de roedor endógeno, la segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico se expresa bajo el control regulador de elementos promotores y reguladores del MHC II  $\beta$  endógeno, y la tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC II quimérico se expresa bajo el control regulador de elementos promotores y  
65

reguladores del MHC I de roedor endógeno, y/o

en donde la secuencia de la región variable del TCR $\alpha$  sin reordenar se expresa bajo el control regulador de elementos promotores y reguladores del TCR $\alpha$  endógeno y la secuencia de la región variable del TCR $\beta$  sin reordenar se expresa bajo el control regulador de elementos promotores y reguladores del TCR $\beta$  endógeno.

5

8. El roedor modificado genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde

10 (a) una secuencia que codifica la porción extracelular, o una parte de la misma, de un polipéptido del correceptor de CD4 humano reemplaza una secuencia que codifica una porción extracelular, o una parte de la misma, de un polipéptido del correceptor de CD4 de roedor endógeno, y está unida operativamente a secuencias codificantes de dominios transmembrana y citoplasmáticos de CD4 de roedor endógeno en un locus del correceptor de linfocitos T CD4 de roedor endógeno para formar la primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del correceptor de CD4 quimérico, y/o

15 (b) una secuencia que codifica la porción extracelular, o una parte de la misma, de un polipéptido del correceptor de CD8 $\alpha$  humano reemplaza una secuencia que codifica una porción extracelular, o una parte de la misma, de un polipéptido del correceptor de CD8 $\alpha$  de roedor endógeno, y está unida operativamente a secuencias codificantes de dominios transmembrana y citoplasmáticos de CD8 $\alpha$  de roedor endógeno en un locus del correceptor de linfocitos T CD8 $\alpha$  de roedor endógeno para formar la segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del correceptor de CD8 $\alpha$  quimérico, y

20 una secuencia que codifica la porción extracelular, o una parte de la misma, de un polipéptido del correceptor de CD8 $\beta$  humano reemplaza una secuencia que codifica una porción extracelular, o una parte de la misma, de un polipéptido del correceptor de CD8 $\beta$  de roedor endógeno, y está unida operativamente a secuencias codificantes de dominios transmembrana y citoplasmáticos de CD8 $\beta$  de roedor endógeno en un locus del correceptor de linfocitos T CD8 $\beta$  endógeno para formar la tercera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del correceptor de CD8 $\beta$  quimérico; y/o

25 (c) una secuencia que codifica los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de un polipéptido de HLA de clase II  $\alpha$  humano reemplaza una secuencia que codifica los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de un polipéptido del MHC II  $\alpha$  de roedor endógeno, y está unida operativamente a secuencias codificantes de dominios transmembrana y citoplasmáticos del polipéptido del MHC II  $\alpha$  endógeno en un locus del MHC II  $\alpha$  de roedor endógeno para formar la primera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico,

30 una secuencia que codifica los dominios  $\beta 1$  y  $\beta 2$  de un polipéptido de HLA de clase II  $\beta$  humano reemplaza una secuencia que codifica los dominios  $\beta 1$  y  $\beta 2$  de un polipéptido del MHC II  $\beta$  de roedor endógeno, y está unida operativamente a secuencias codificantes de dominios transmembrana y citoplasmáticos del polipéptido del MHC II  $\beta$  endógeno en un locus del MHC II  $\beta$  de roedor endógeno para formar la segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico, y/o

35 (d) una secuencia que codifica los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de un polipéptido de HLA de clase I humano reemplaza una secuencia que codifica los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de un polipéptido del MHC I de roedor endógeno, y está unida operativamente a secuencias codificantes de dominios transmembrana y citoplasmáticos del polipéptido del MHC I endógeno en un locus del MHC I de roedor endógeno para formar la tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC I quimérico y/o

40 (e) la secuencia de la región variable del TCR $\alpha$  sin reordenar reemplaza uno o más segmentos de los genes V $\alpha$  y/o J $\alpha$  endógenos en un locus variable del TCR $\alpha$  endógeno y la secuencia de la región variable del TCR $\beta$  sin reordenar reemplaza uno o más segmentos de genes V $\beta$ , D $\beta$  y/o J $\beta$  endógenos en un locus variable del TCR $\beta$  endógeno.

45

9. El roedor modificado genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el animal no expresa (a) un polipéptido del correceptor de CD4 de roedor endógeno funcional y/o un correceptor de CD8 a partir de loci del correceptor de CD4 y/o CD8 endógeno, respectivamente, (b) un dominio variable del TCR $\alpha$  endógeno a partir de un locus del TCR $\alpha$  endógeno, (c) un dominio variable del TCR $\beta$  endógeno a partir de un locus del TCR $\beta$  endógeno y/o (d) un dominio extracelular de un polipéptido del MHC endógeno a partir de un locus del MHC endógeno en una superficie celular.

50

10. El roedor modificado genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el locus de la  $\beta 2$  microglobulina comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en el exón 1 de un gen de la  $\beta 2$  microglobulina humano o de roedor, y expuesta en el exón 2, el exón 3 y el exón 4 de un gen de la  $\beta 2$  microglobulina humano, en donde el locus de la  $\beta 2$  microglobulina codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la  $\beta 2$  microglobulina humana, en donde el roedor expresa un polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina humano o humanizado, en donde el roedor opcionalmente no expresa un polipéptido de la  $\beta 2$  microglobulina de roedor endógeno funcional a partir de un locus de la  $\beta 2$  microglobulina de roedor endógeno, y en donde el locus de la  $\beta 2$  microglobulina está unido operativamente a elementos reguladores de la  $\beta 2$  microglobulina de roedor endógenos.

60

11. El roedor modificado genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el roedor es un ratón.

65 12. El roedor modificado genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el roedor es un ratón, y en donde el ratón expresa

polipéptidos de correceptores de CD4, CD8 $\alpha$  y CD8 $\beta$  de linfocitos T quiméricos, que comprenden cada uno respectivamente una porción extracelular de CD4, CD8 $\alpha$  y CD8 $\beta$  humanos;

un receptor de linfocitos T que comprende una región variable del TCR $\alpha$  humano y una región variable del TCR $\beta$  humano en la superficie de un linfocito T; y

polipéptidos del MHC II  $\alpha$ , MHC II  $\beta$  y MHC I quiméricos que comprenden cada uno respectivamente los dominios  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 de un polipéptido de HLA de clase II  $\alpha$  humano, los dominios  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 de un polipéptido de HLA de clase II  $\beta$  humano y los dominios  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3 de un polipéptido de HLA de clase I humano; y

un polipéptido de la  $\beta$ 2 microglobulina humanizado.

13. El roedor modificado genéticamente de la reivindicación 12, en donde la primera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico codifica una cadena  $\alpha$  de un polipéptido de HLA-DR/H-2E quimérico humano/murino, la segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico codifica una cadena  $\beta$  de un polipéptido de HLA-DR/H-2E quimérico humano/murino y la tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC I quimérico codifica un polipéptido de HLA-A/H-2K quimérico humano/murino, y en donde el ratón expresa las proteínas HLA-A/H-2K y HLA-DR/H-2E.

14. Un método de generación de un roedor modificado genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende modificar el genoma del roedor para que comprenda

(a) una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del correceptor de CD4 quimérico y/o una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del correceptor de CD8 $\alpha$  quimérico y una tercera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del correceptor de CD8 $\beta$  quimérico,

en donde la primera secuencia de nucleótidos codifica la porción extracelular, o una parte de la misma, de un polipéptido del correceptor de CD4 humano unido operativamente a al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del correceptor de CD4 de roedor,

en donde la segunda secuencia de nucleótidos codifica la porción extracelular, o una parte de la misma, de un polipéptido del correceptor de CD8 $\alpha$  humano y al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del correceptor de CD8 $\alpha$  de roedor,

en donde la tercera secuencia de nucleótidos codifica la porción extracelular, o una parte de la misma, de un polipéptido del correceptor de CD8 $\beta$  humano y al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del correceptor de CD8 $\beta$  de roedor;

(b) una secuencia de la región variable  $\alpha$  del receptor de linfocitos T (TCR) sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\alpha$  humano y al menos un segmento J $\alpha$  humano, unida operativamente a una secuencia de la región constante del TCR $\alpha$  de roedor y/o una secuencia de la región variable del TCR $\beta$  sin reordenar que comprende al menos un segmento V $\beta$  humano, al menos un segmento D $\beta$  humano, y al menos un segmento J $\beta$  humano, unida operativamente a una secuencia de la región constante del TCR $\beta$  de roedor;

(c) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC II  $\alpha$  quimérico, una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC II  $\beta$  quimérico y/o una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del MHC I quimérico,

en donde la primera secuencia de ácido nucleico codifica los dominios  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 de un polipéptido de HLA de clase II  $\alpha$  humano y al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del MHC II  $\alpha$  de roedor,

en donde la segunda secuencia de ácido nucleico codifica los dominios  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 de un polipéptido de HLA de clase II  $\beta$  humano y al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del MHC II  $\beta$  de roedor,

en donde la tercera secuencia de ácido nucleico codifica los dominios  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3 de un polipéptido de HLA de clase I humano y al menos los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido del MHC I de roedor; y

(d) un locus de la  $\beta$ 2 microglobulina que codifica un polipéptido de la  $\beta$ 2 microglobulina humano o humanizado.

15. El roedor modificado genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, o generado de acuerdo con el método de la reivindicación 14, en donde el roedor no expresa polipéptidos del MHC I endógeno y del MHC II endógeno en una superficie celular.

16. Un método de generación de una respuesta de linfocitos T humanizados en un roedor que comprende inmunizar un roedor de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 y 15, o generado de acuerdo con el método de la reivindicación 14, con un antígeno.

FIG. 1

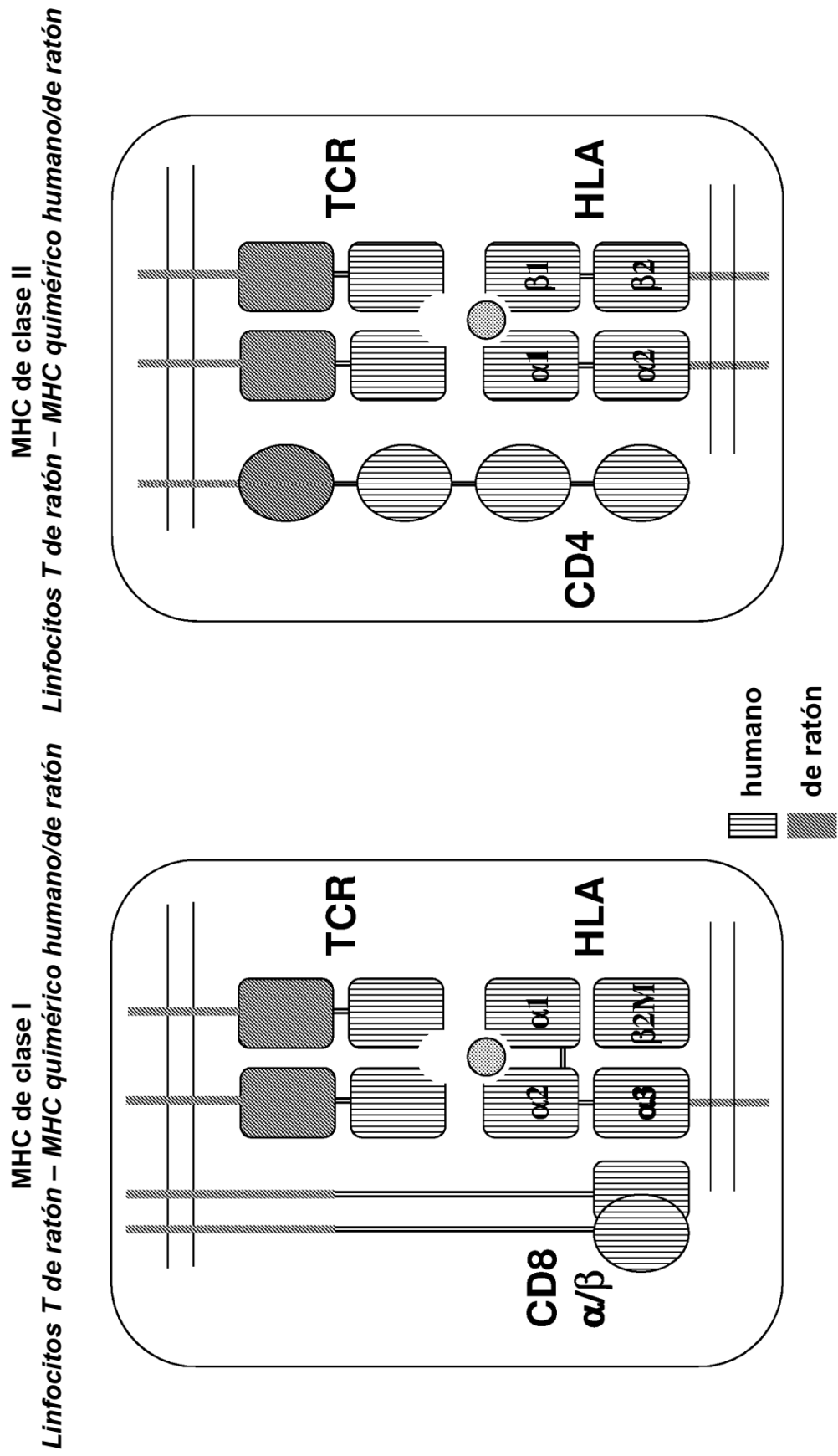


FIG.2A Locus de HLA-A2/H-2K quimérico

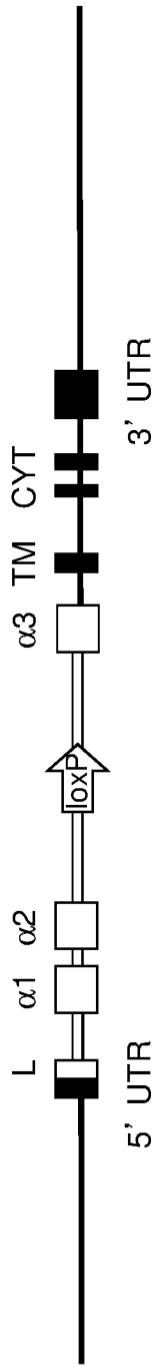


FIG. 2B Locus de HLA-DR2/H-2E quimérico

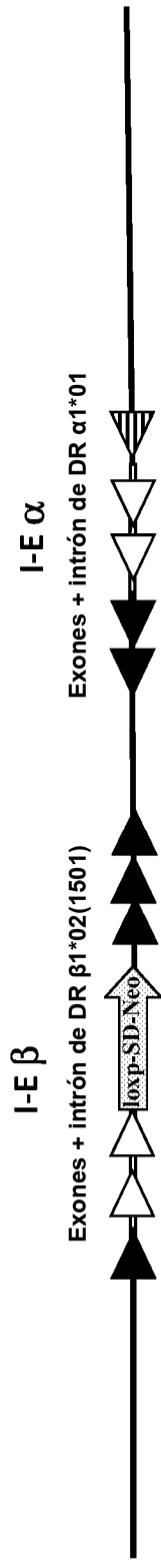


FIG. 2C Locus de β2m humanizado

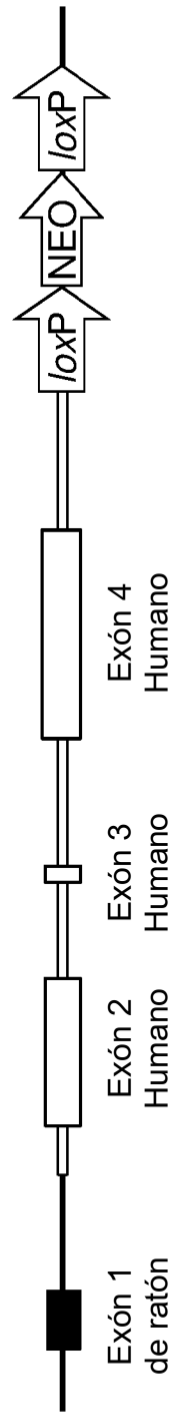


FIG. 3A

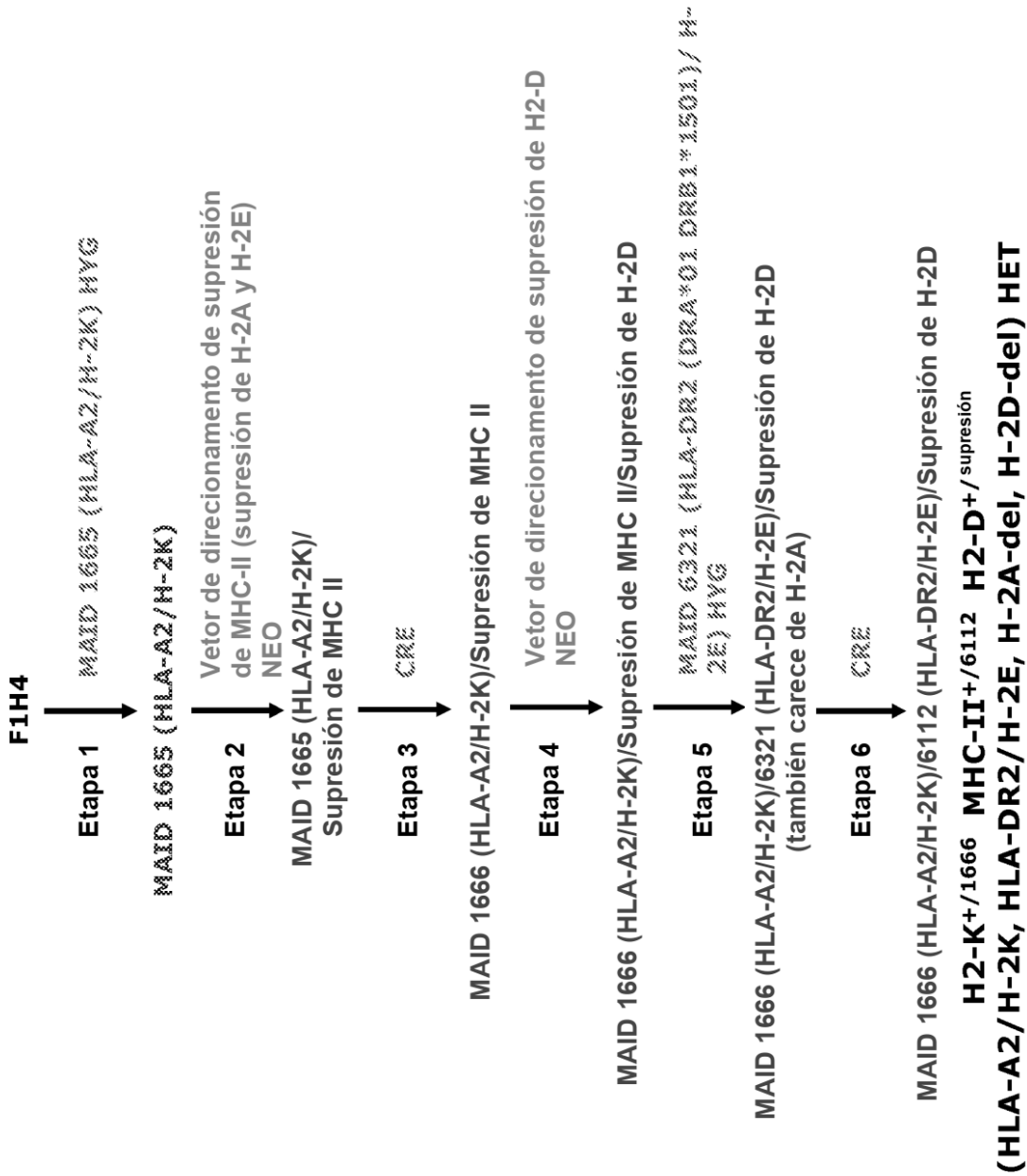




FIG. 3B

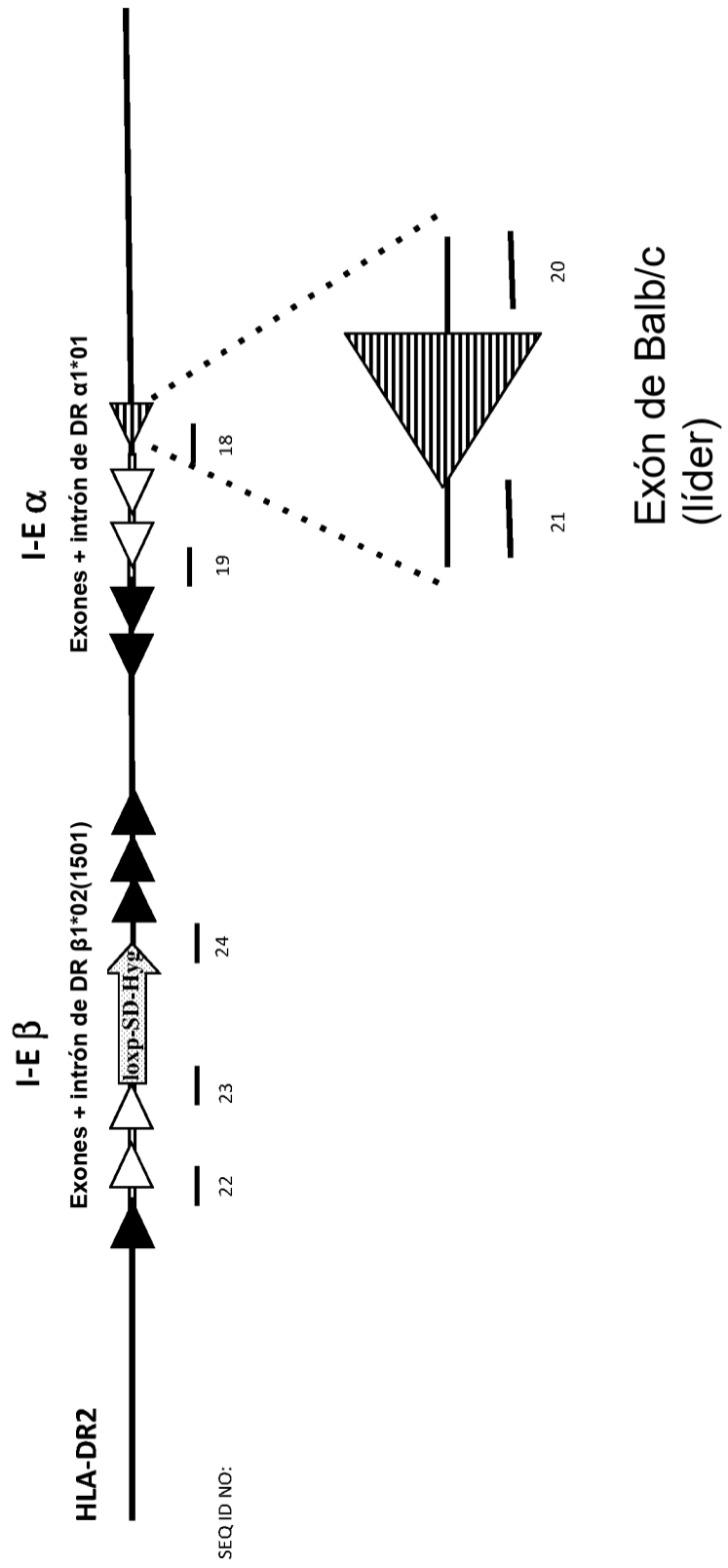
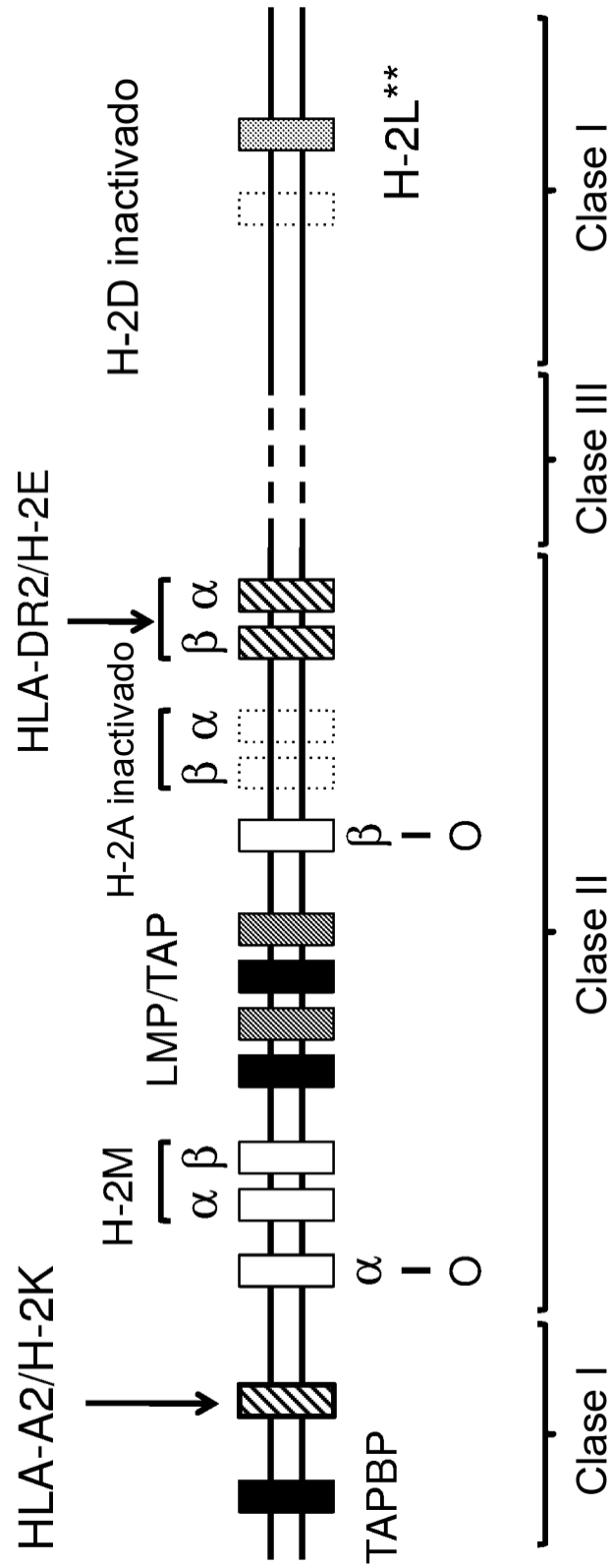
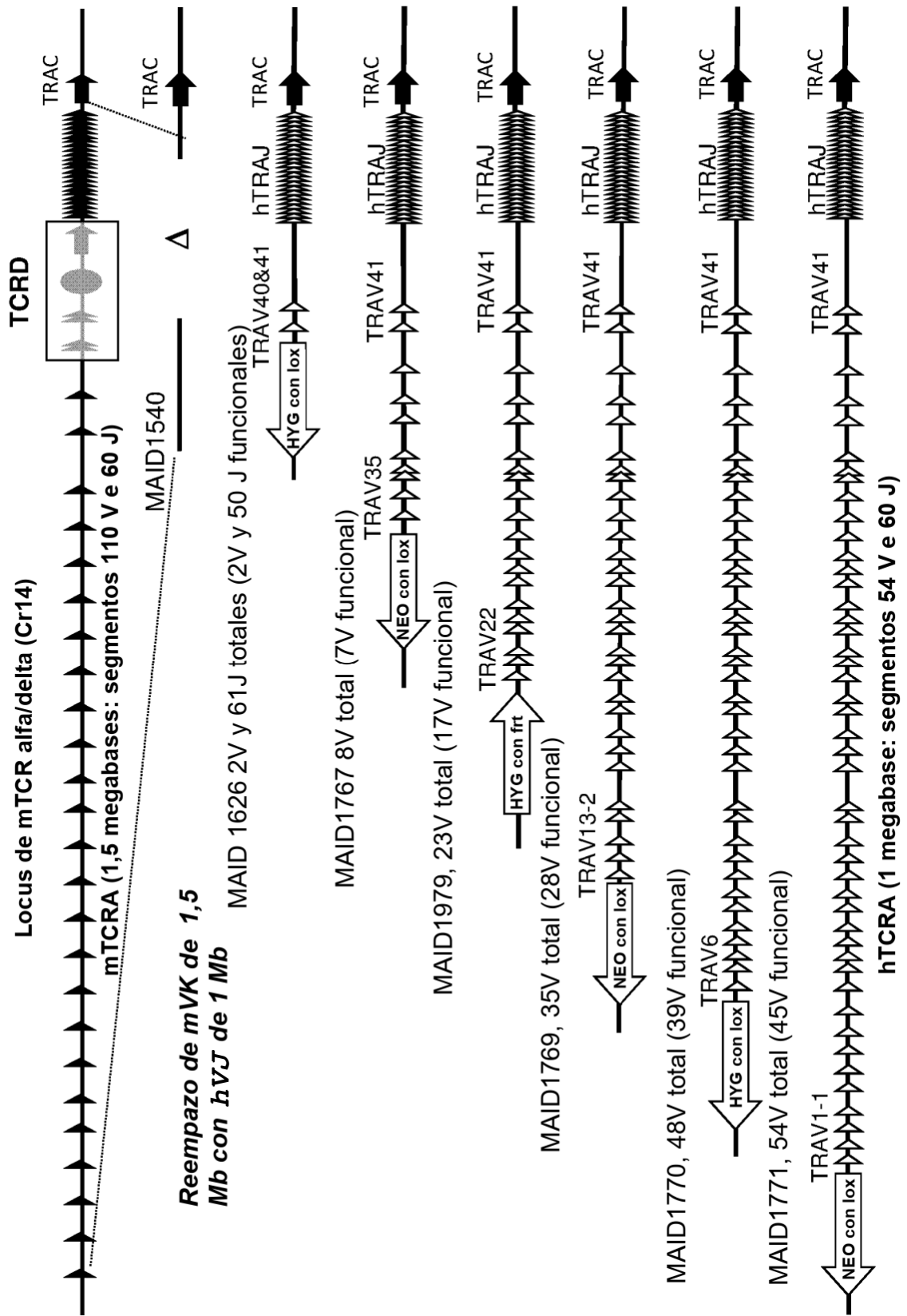


FIG. 3C



**FIG. 4A**



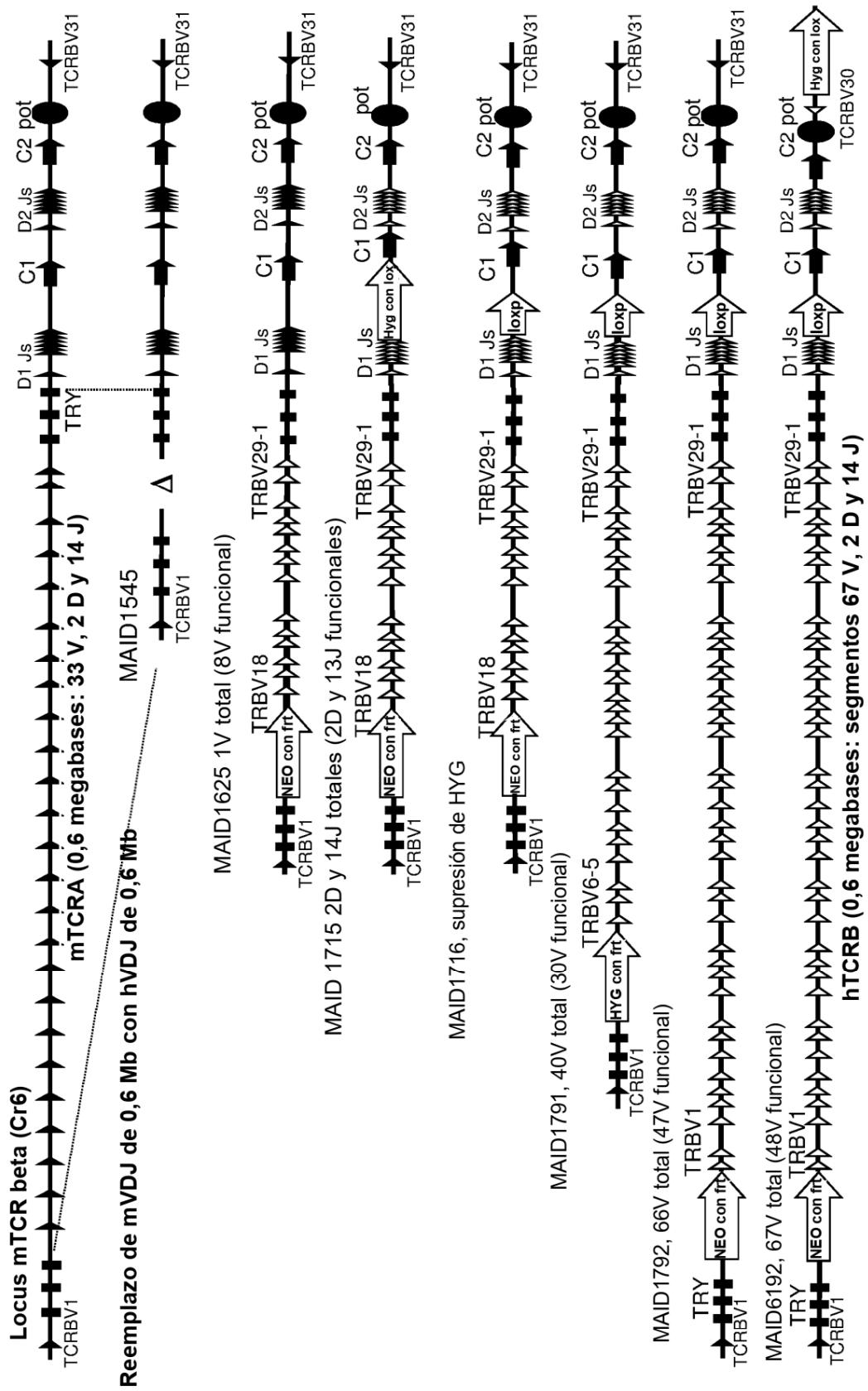
**FIG. 4B**

FIG. 5A

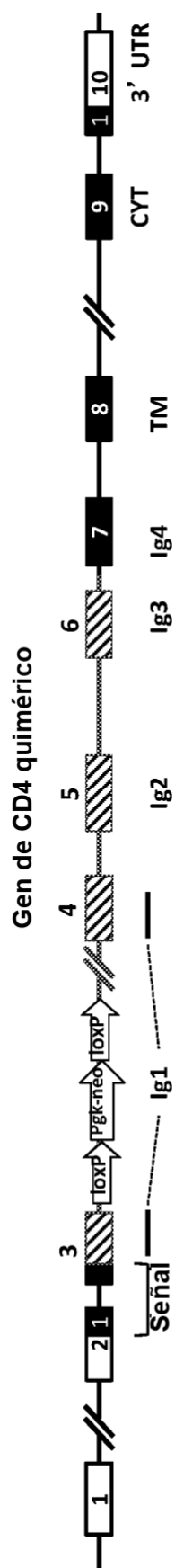
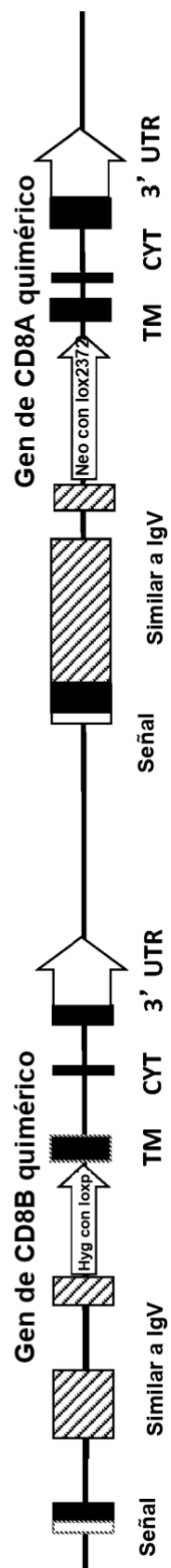
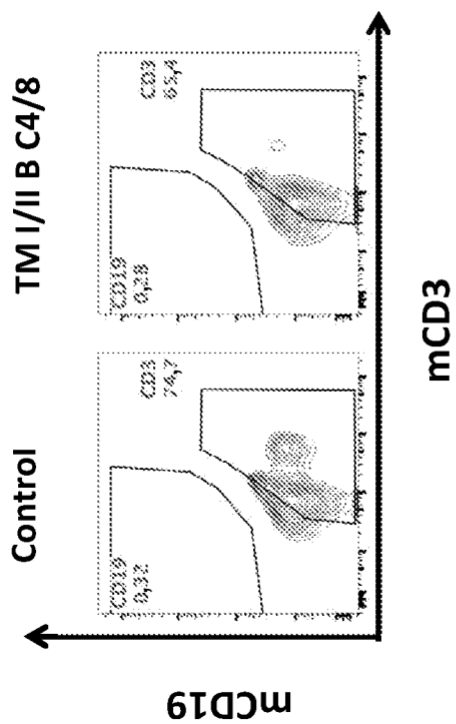


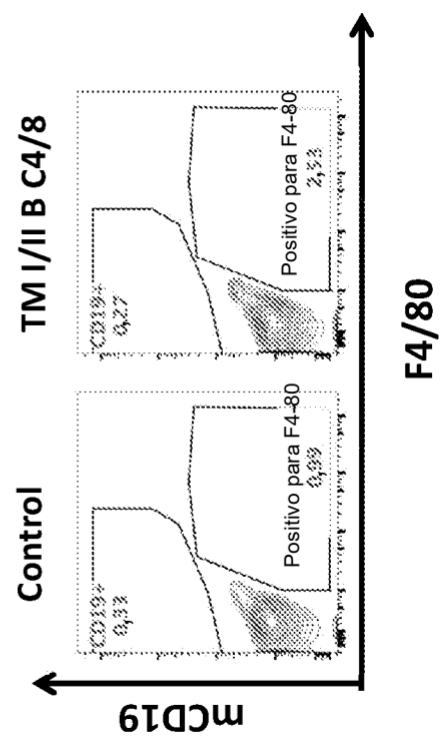
FIG. 5B



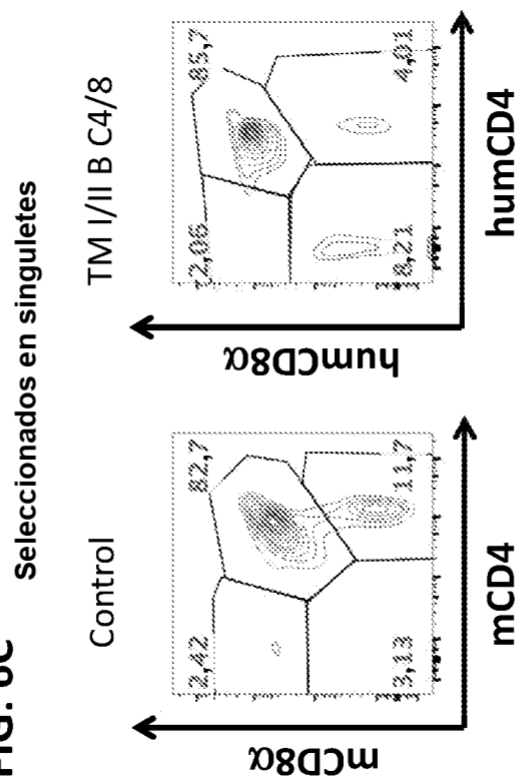
**FIG. 6A** Selecciónados en singletes



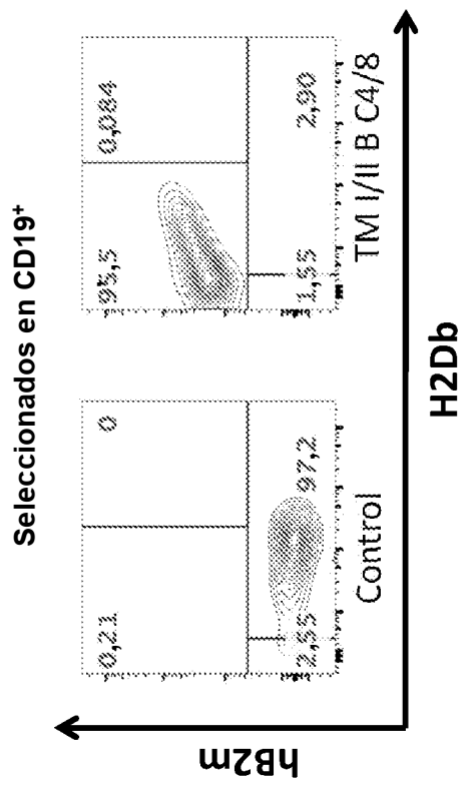
**FIG. 6B** Selecciónados en singletes



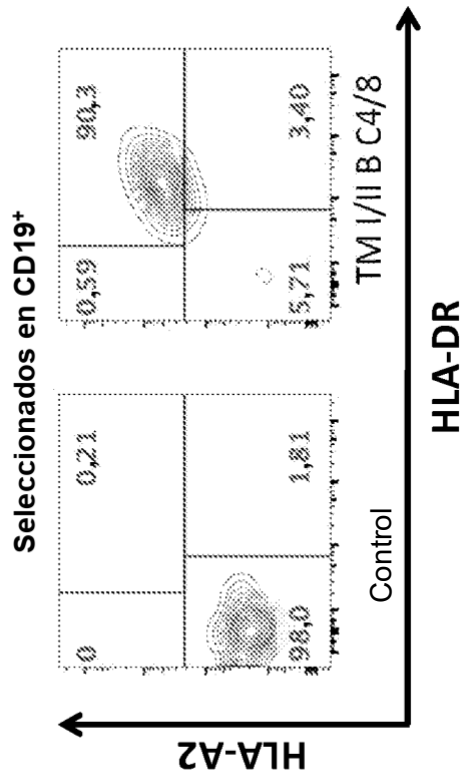
**FIG. 6C**



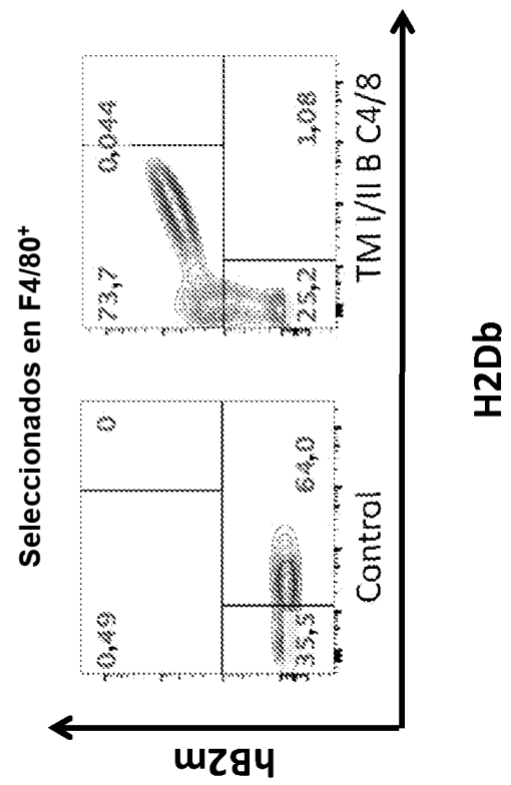
**FIG. 7A**



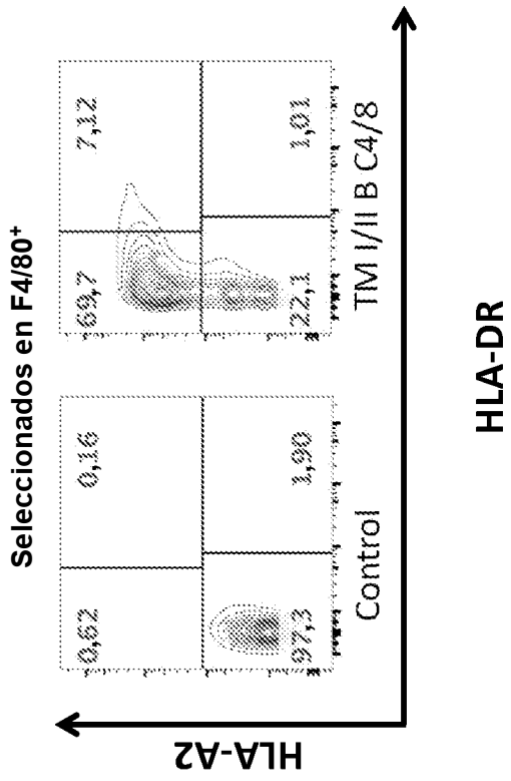
**FIG. 7C**



**FIG. 7B**



**FIG. 7D**



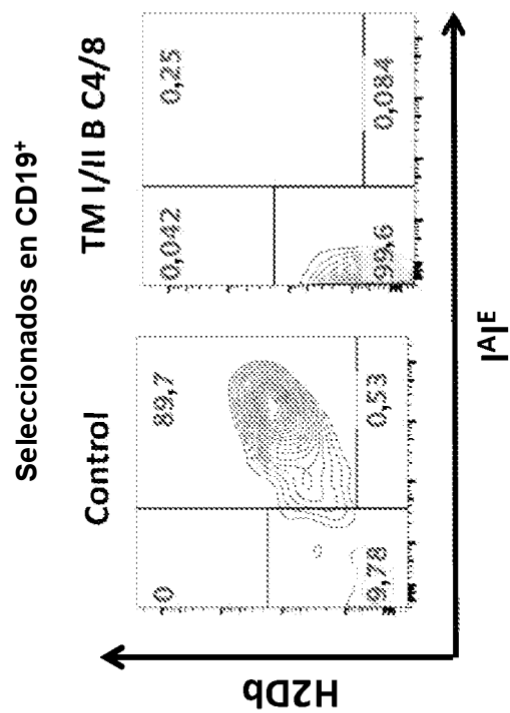


FIG. 7E

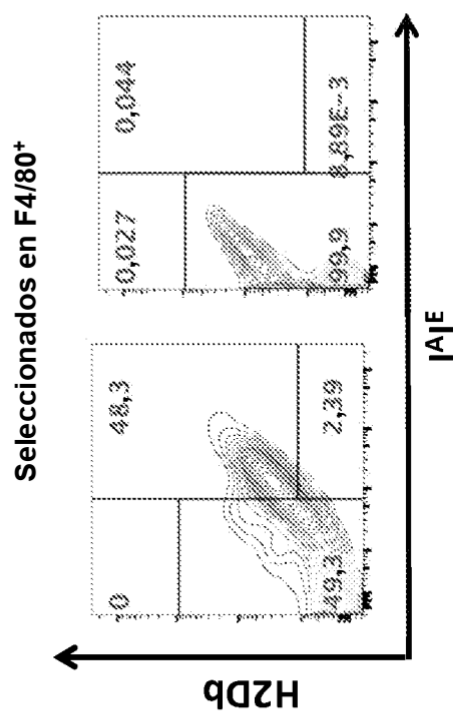
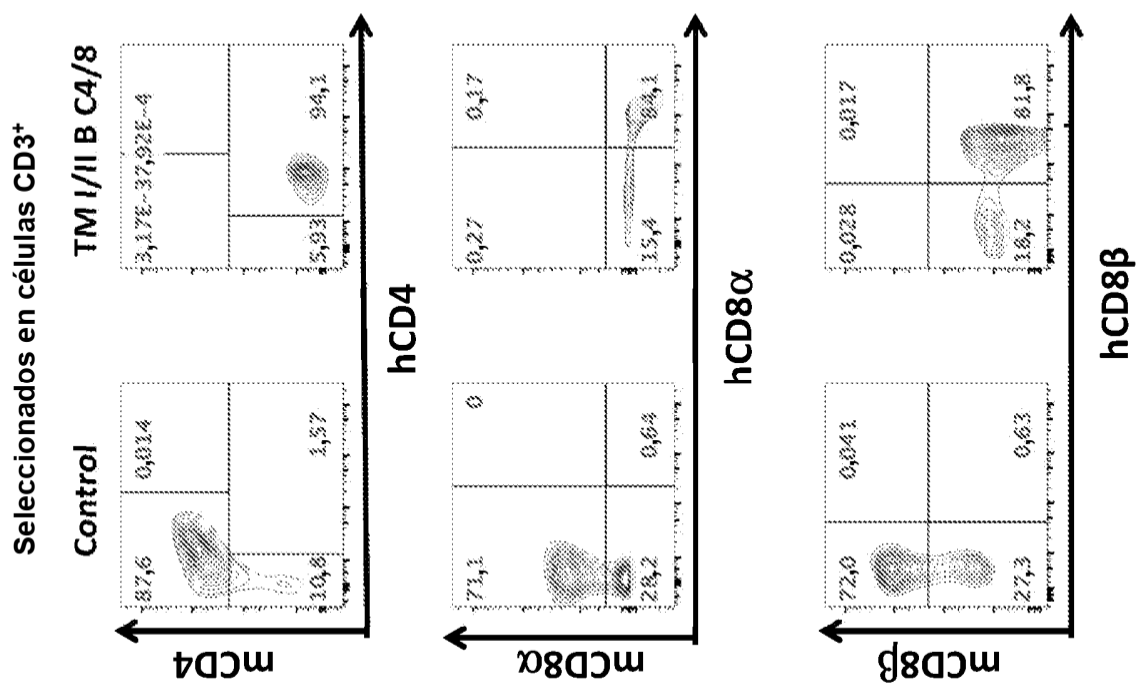


FIG. 7F

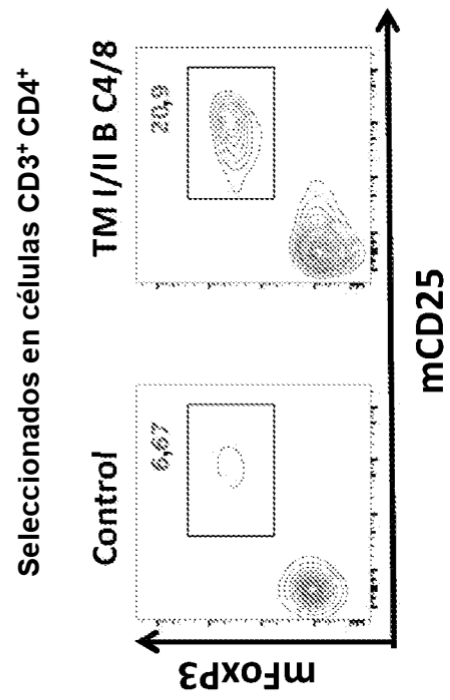


FIG. 7G



**FIG. 8**

Timo



Bazo

FIG. 9A Seleccionados en singletes

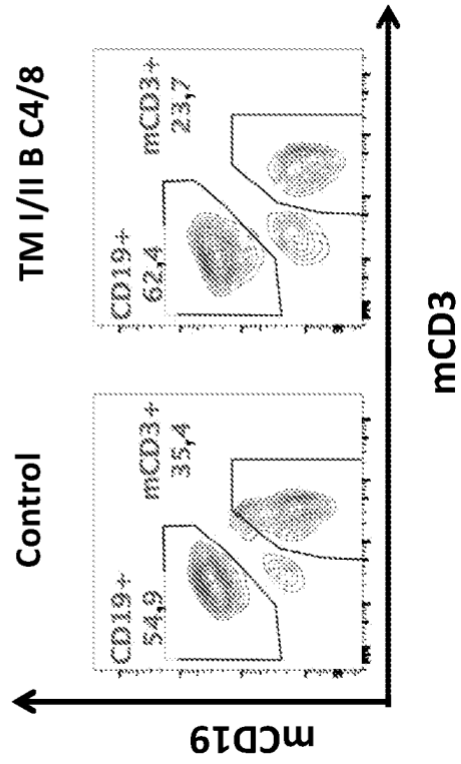


FIG. 9B Seleccionados en singletes

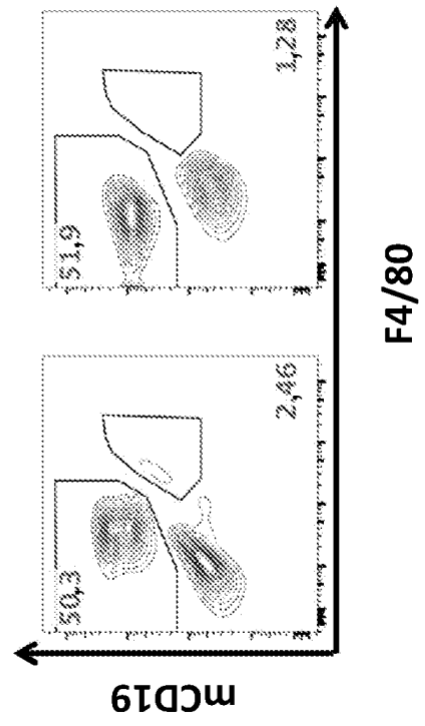
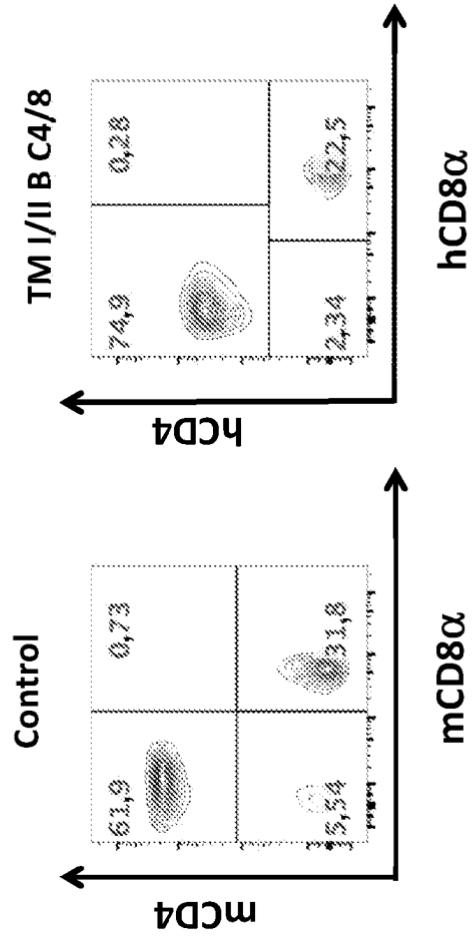
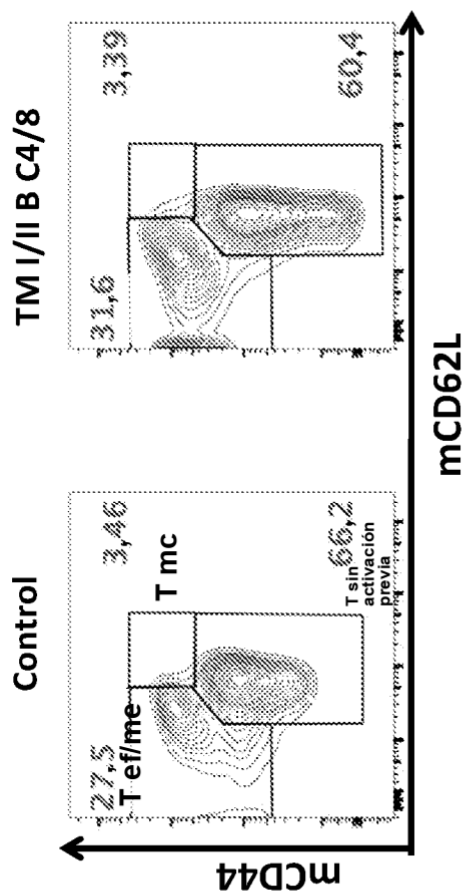


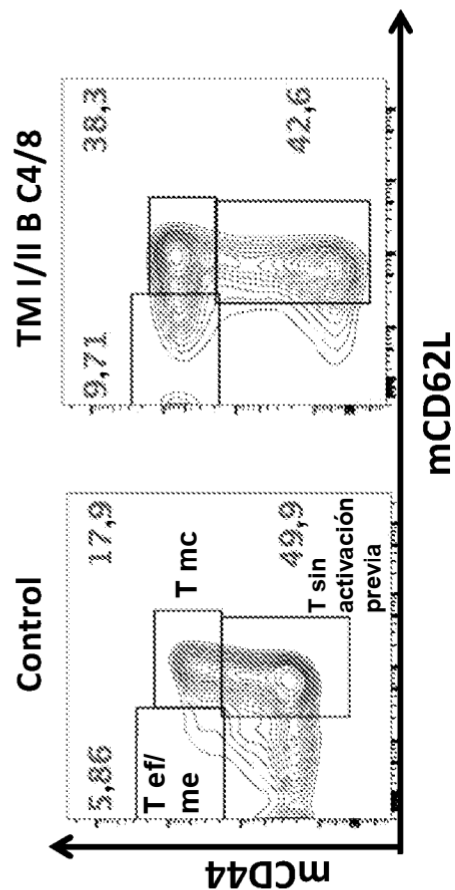
FIG. 9C Seleccionados en células CD3<sup>+</sup>



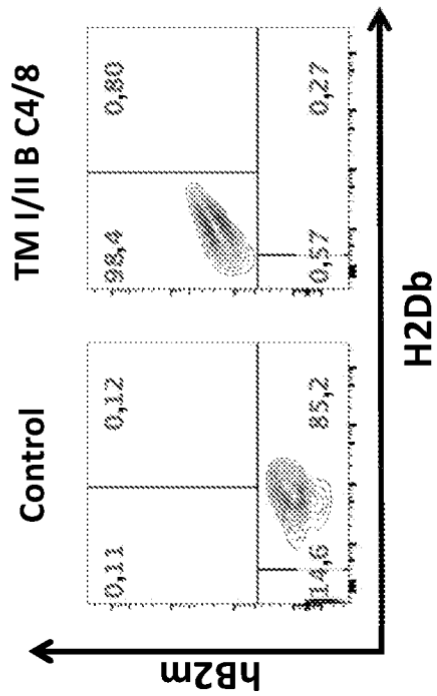
**FIG. 9D** Selecciónados en células T CD4<sup>+</sup>



**FIG. 9E** Selecciónados en células T CD8<sup>+</sup>

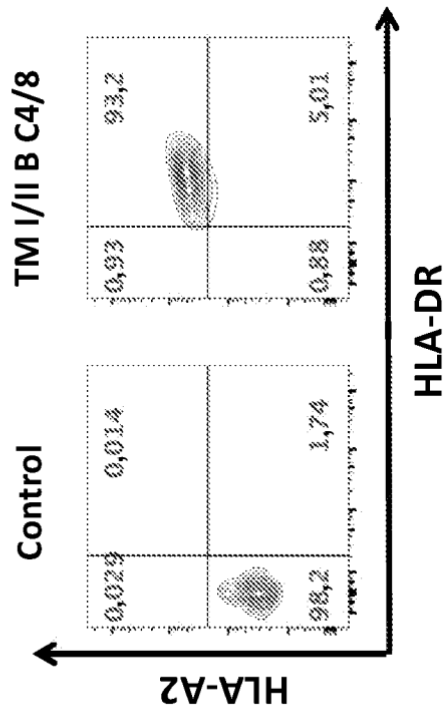


**FIG. 10A** Seleccionados en CD19<sup>+</sup>

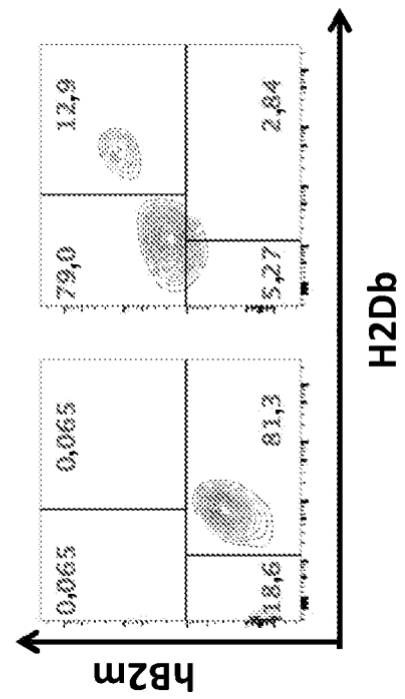


**FIG. 10C**

Seleccionados en CD19<sup>+</sup>

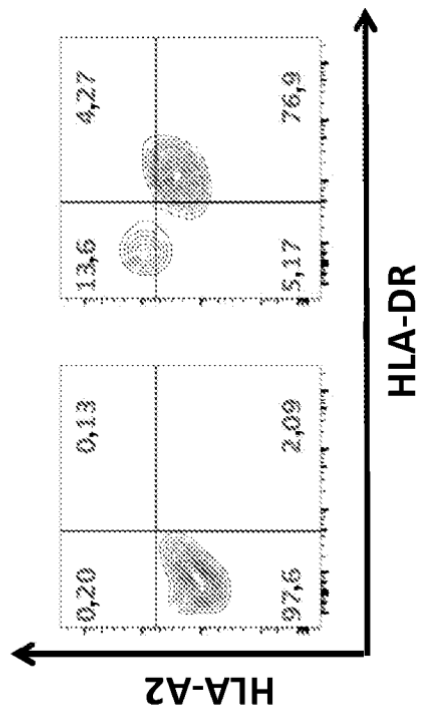


**FIG. 10B** Seleccionados en F4/80<sup>+</sup>



**FIG. 10D**

Seleccionados en F4/80<sup>+</sup>



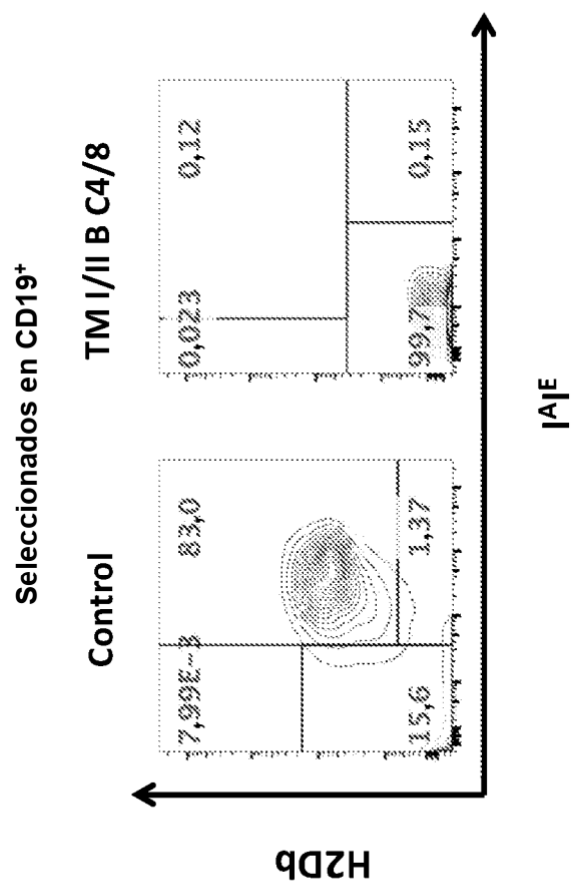


FIG. 10E

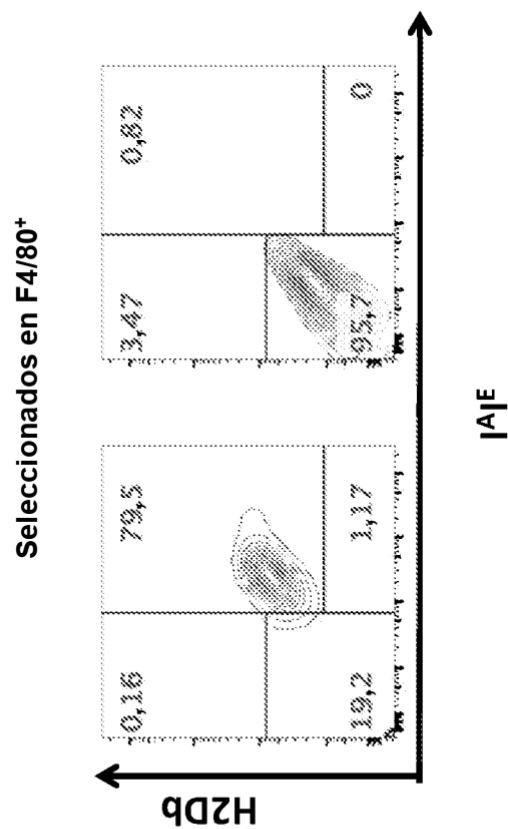
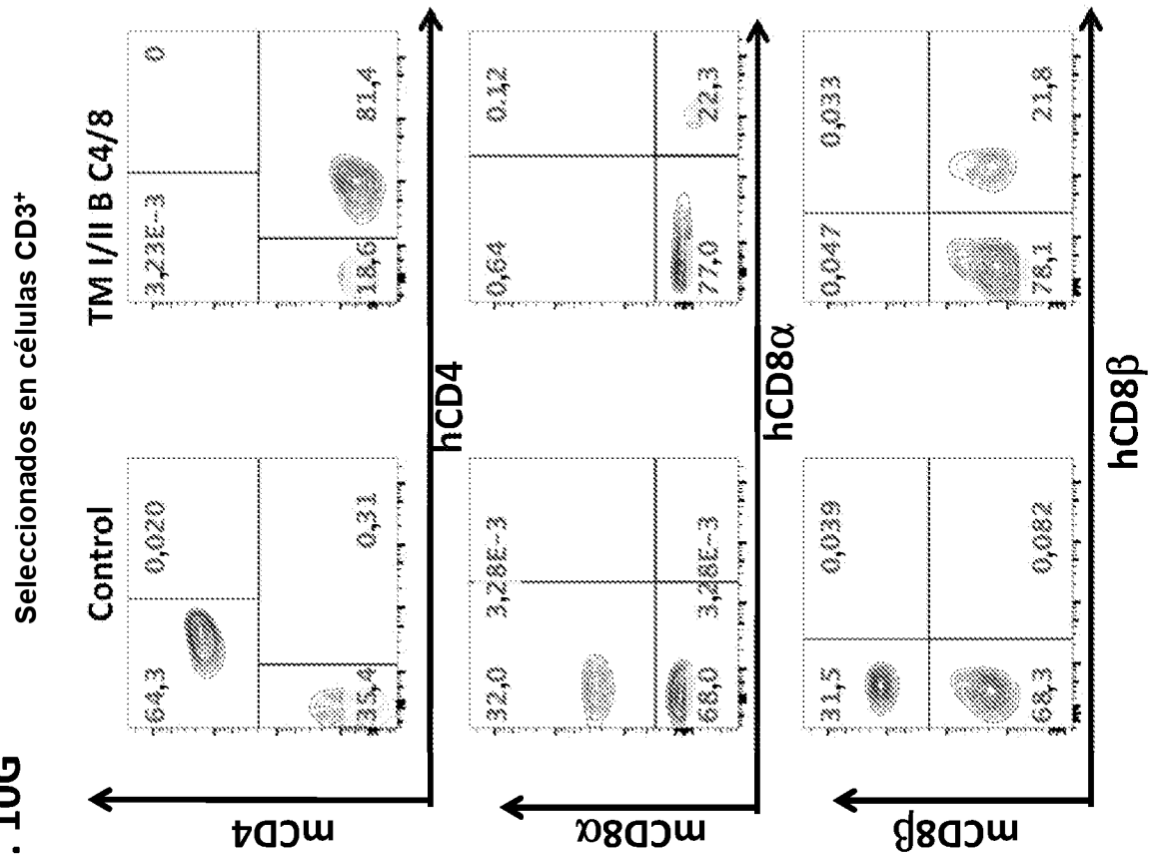


FIG. 10F

FIG. 10G



**FIG. 11**  
**Bazo**

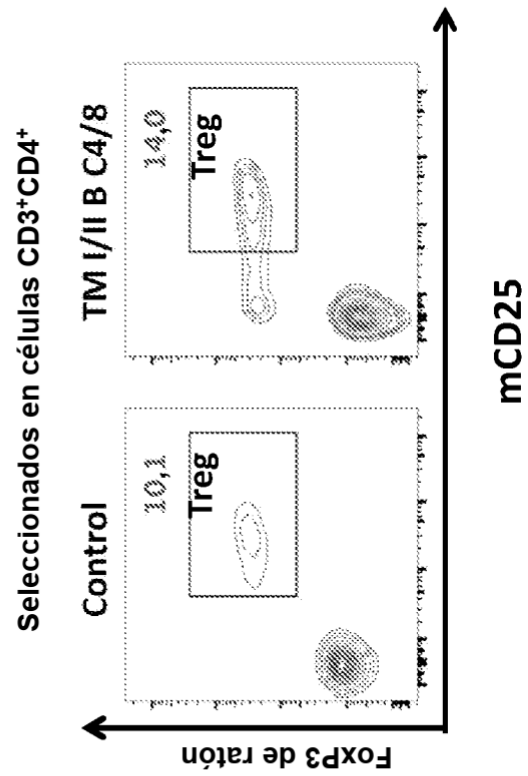
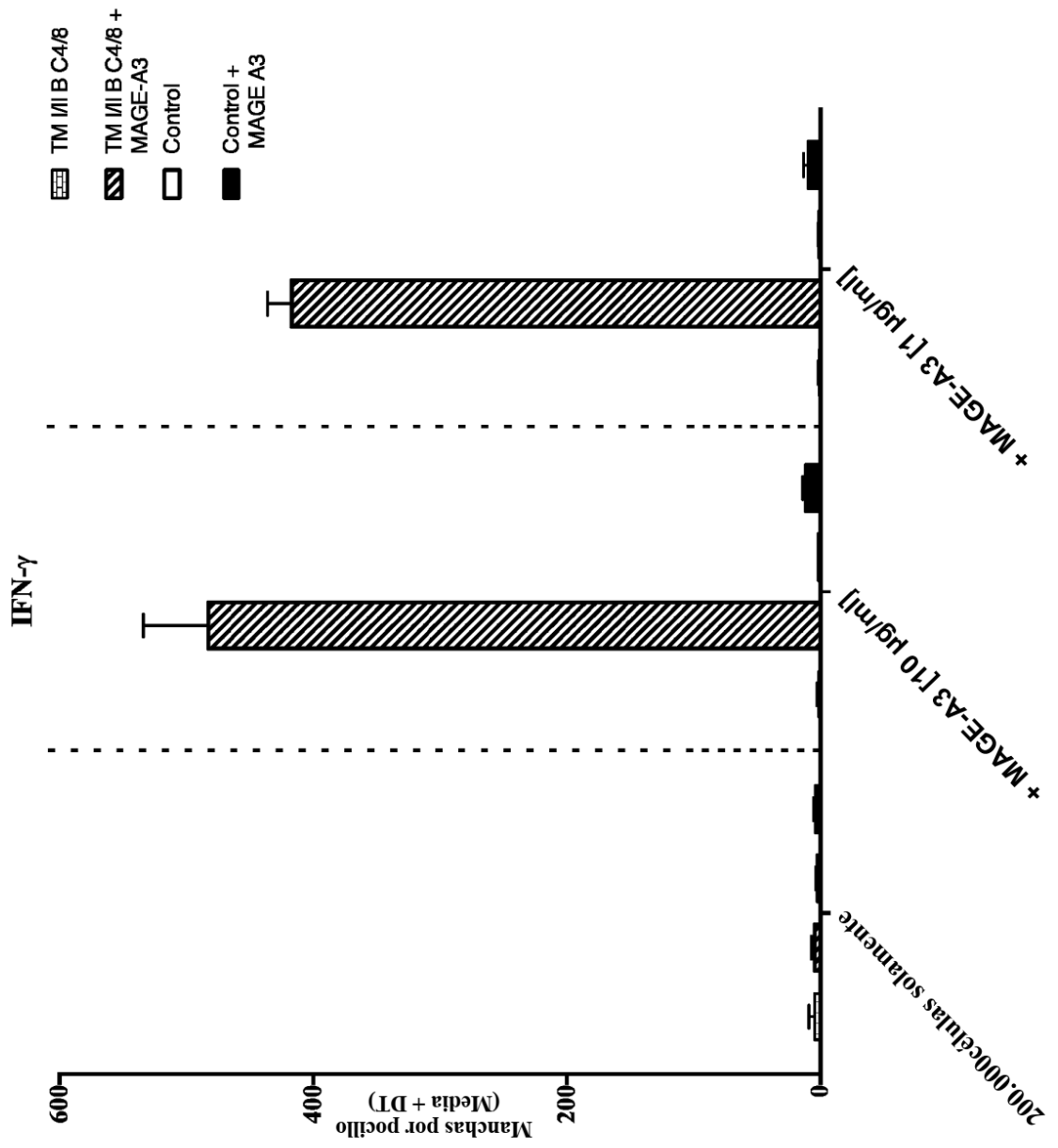
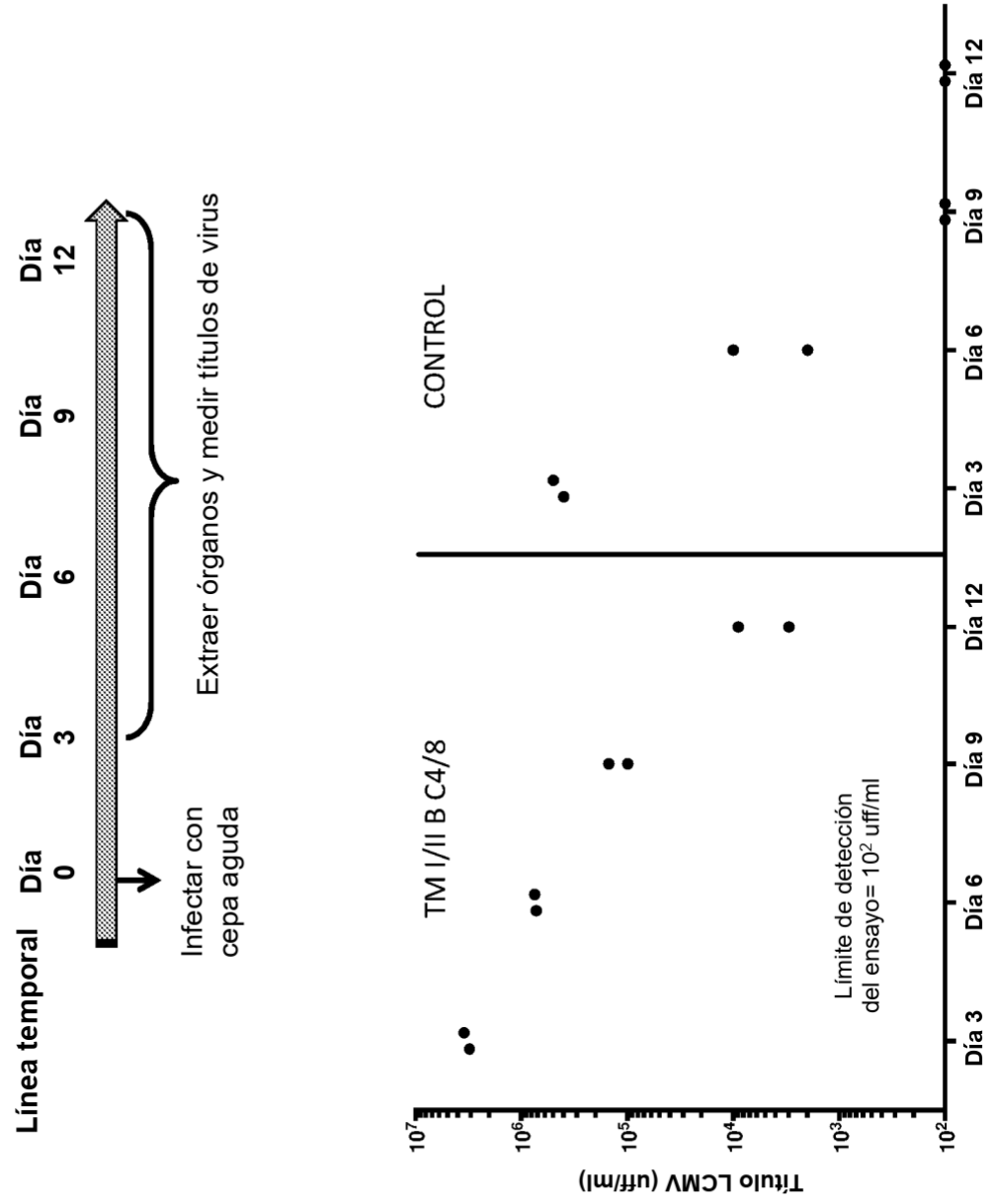




FIG. 12



**FIG. 13A**  
**Infección por Armstrong**



**FIG. 13B**

**Infección por clon 13**

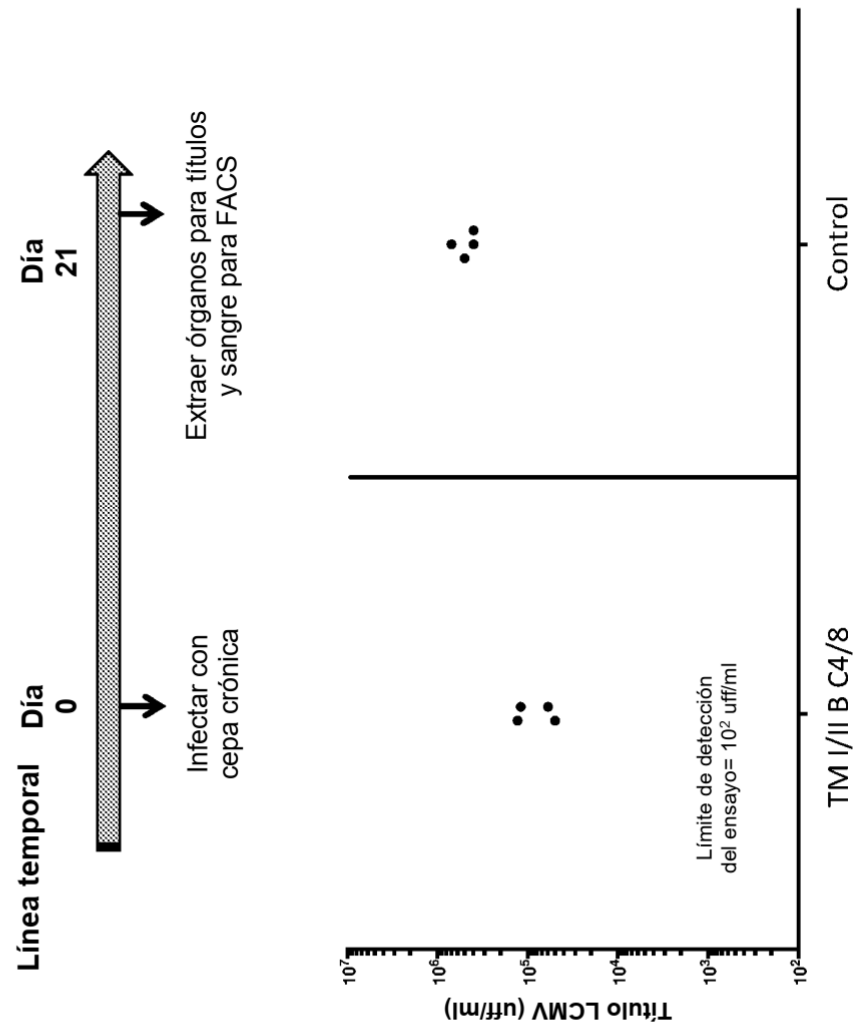


FIG. 13C

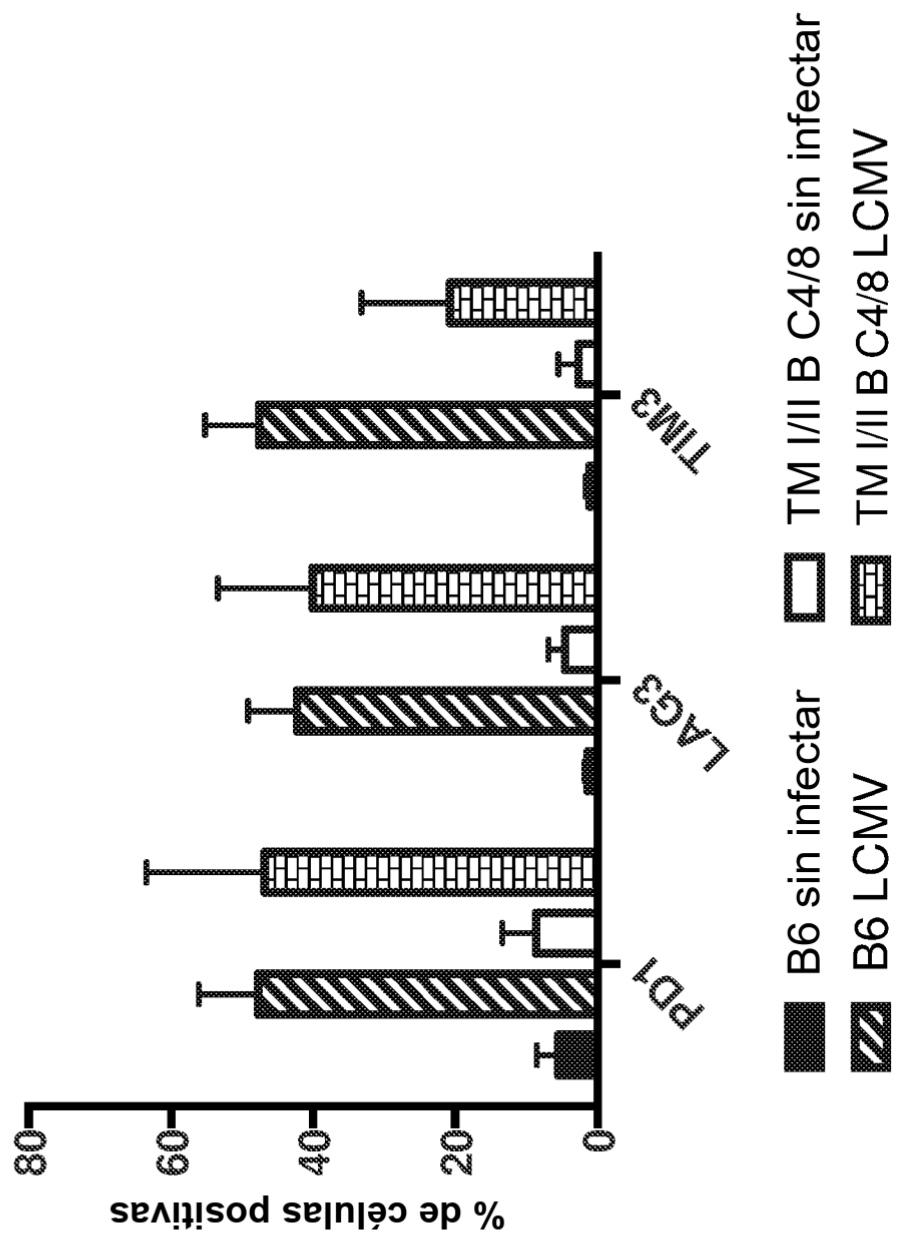


FIG. 14

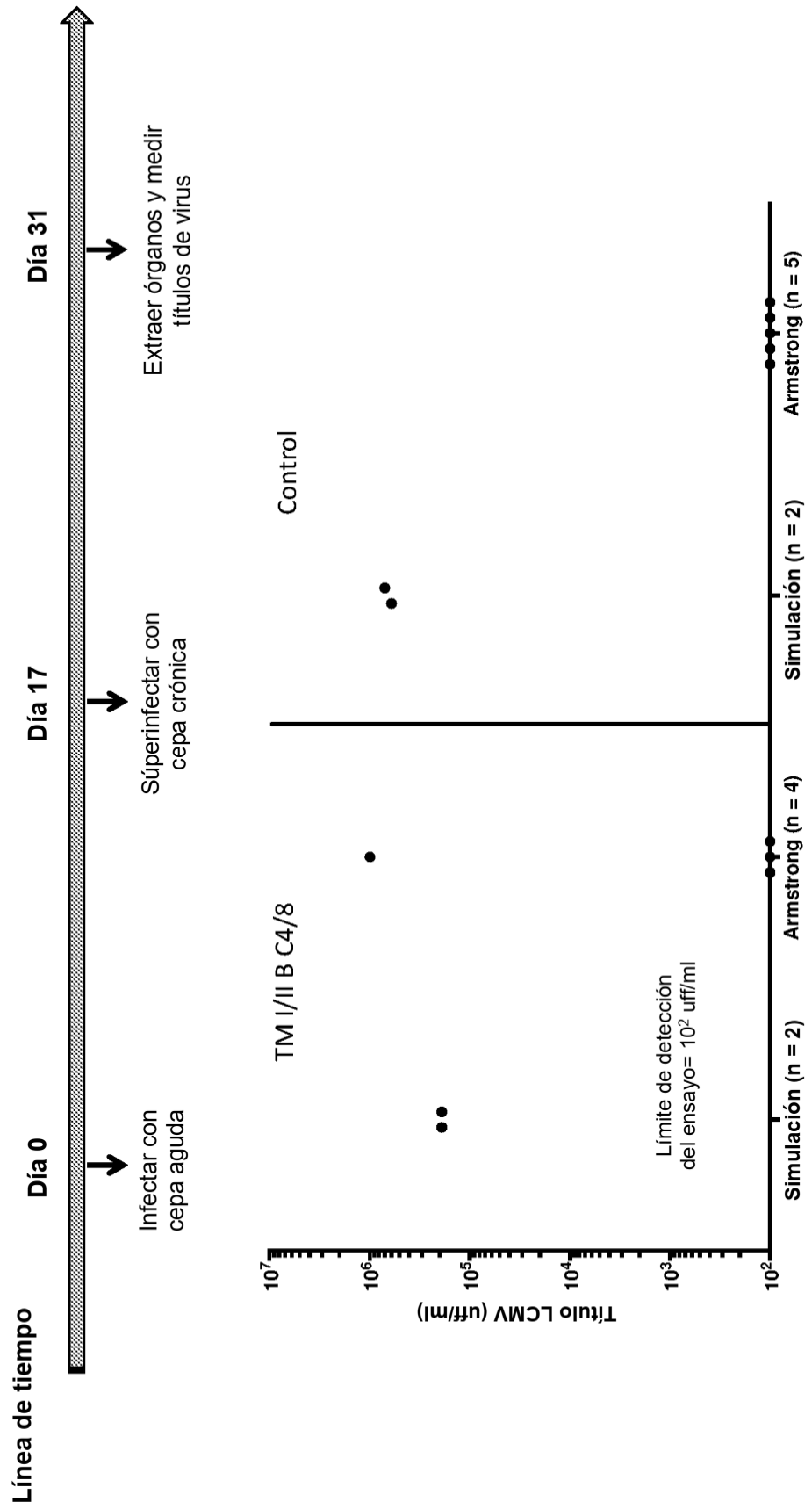


FIG. 15A

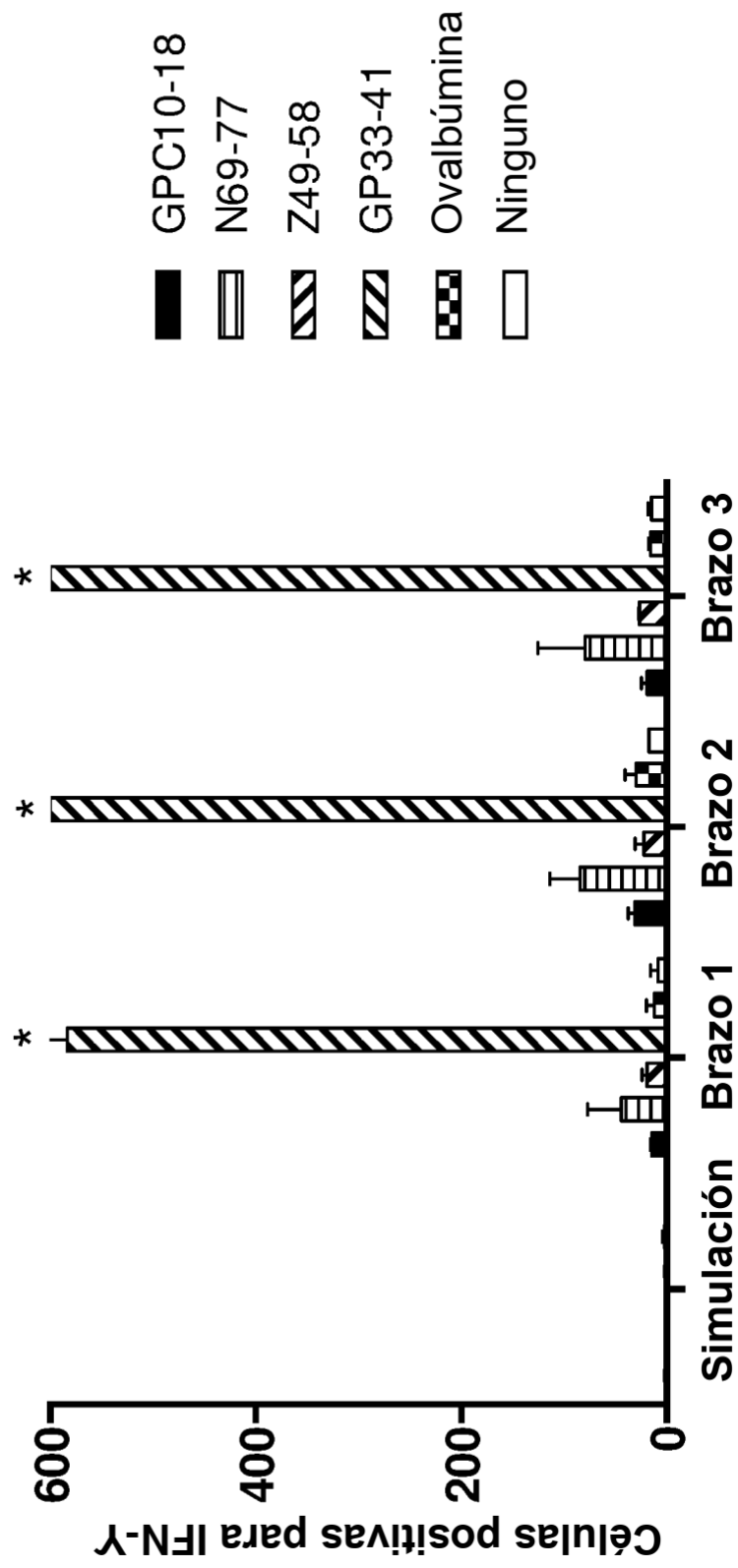


FIG. 15B

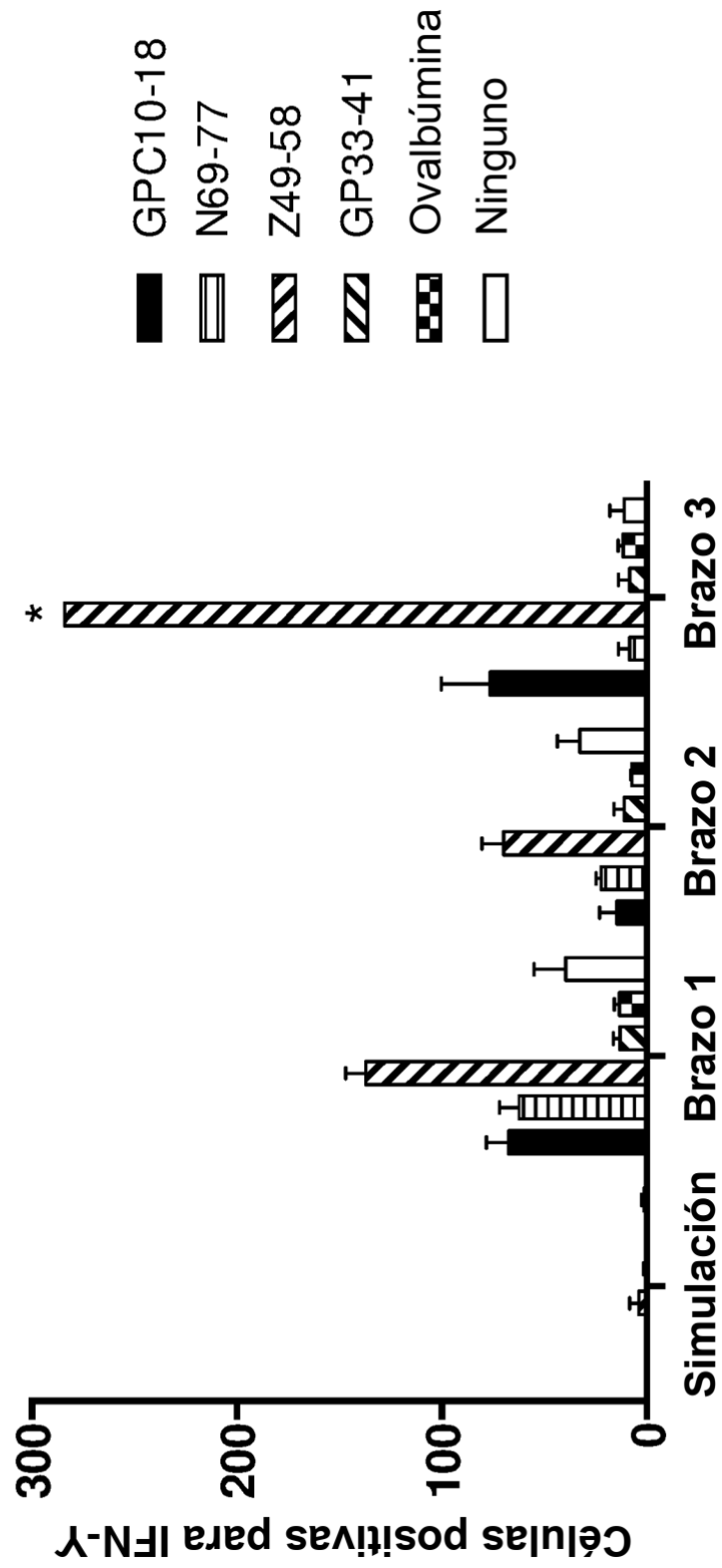


FIG. 15C

% de IFN gamma de CD8  
de ratones TM I/II B C4/8

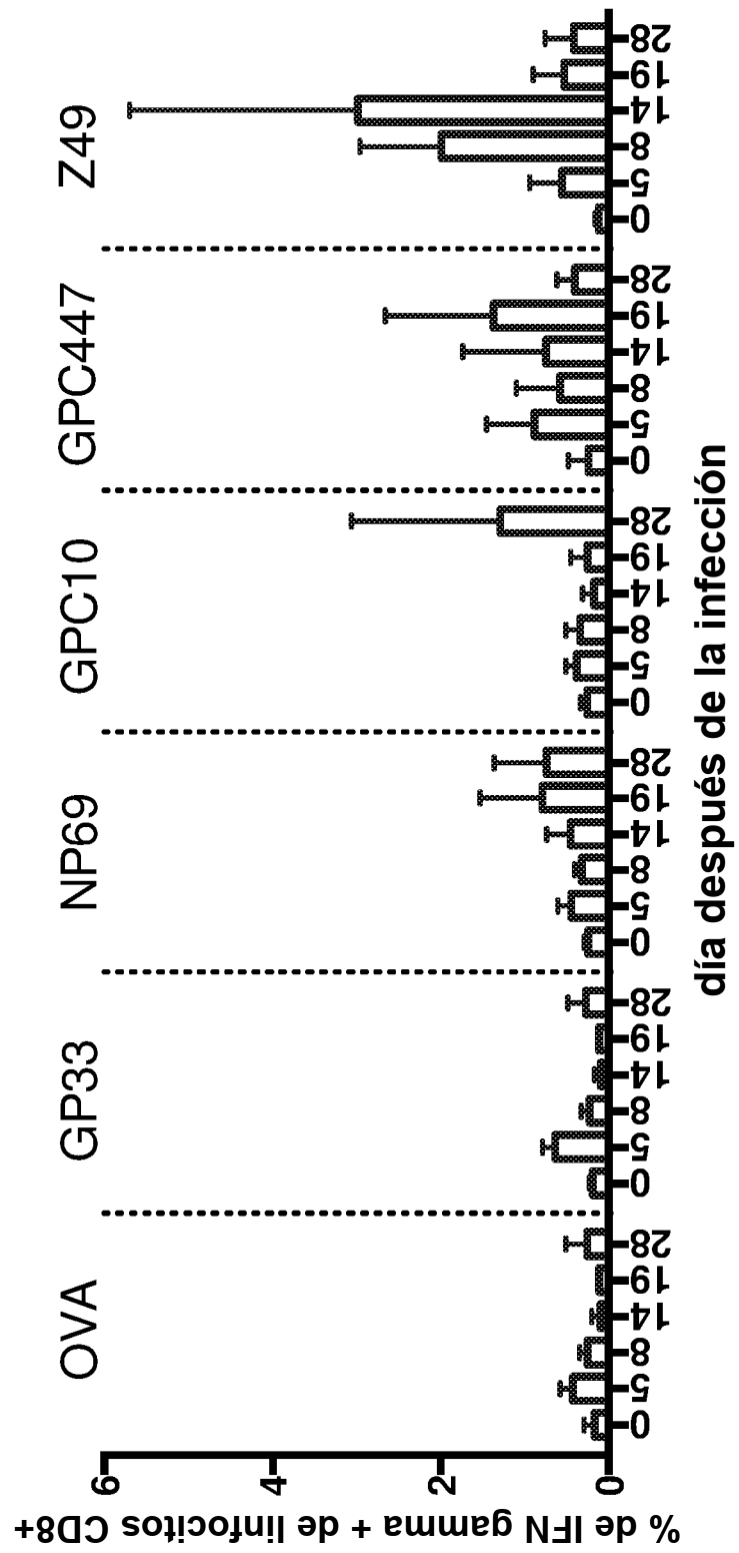




FIG. 15D

