

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 445**

51 Int. Cl.:

C07K 14/73 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A01K 67/027 (2014.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2014** **E 19159217 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024** **EP 3543253**

54 Título: **Ratones que expresan co-receptores humanizados de células T**

30 Prioridad:

20.02.2013 US 201361766762 P

15.10.2013 US 201361890915 P

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

14.11.2024

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

(100.0%)

777 Old Saw Mill River Road

Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

MACDONALD, LYNN;

MURPHY, ANDREW, J.;

TU, NAXIN;

VORONINA, VERA y

GURER, CAGAN

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 2 987 445 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ratones que expresan co-receptores humanizados de células T

5 Listado de secuencias

La presente memoria descriptiva hace referencia a un listado de secuencias presentado en forma electrónica como un archivo .txt ascii nombrado "2010794-0441_ST25" el 20 de febrero de 2014. El archivo .txt se generó el 13 de febrero de 2014 y tiene 47 kb de tamaño.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una célula de roedor (por ejemplo, un ratón o una rata) que está genéticamente diseñada para expresar un co-receptor de células T humanizado. La presente invención se refiere a una célula de roedor diseñada genéticamente para expresar un co-receptor de CD4 humanizado, así como embriones y tejidos que expresan el mismo. La divulgación también se refiere a un animal no humano diseñado para co-expresar un co-receptor de CD4 humanizado y un Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) II humanizado. La divulgación se refiere además a un animal no humano diseñado para co-expresar un co-receptor CD8 humanizado y un MHC I humanizado. También se proporcionan métodos para fabricar un animal genéticamente modificado que expresa un co-receptor de células T humanizado (por ejemplo, CD4 o CD8 humanizado). También se describen métodos para usar los animales genéticamente modificados que expresan co-receptores de células T humanizadas para desarrollar productos terapéuticos humanos.

25 Antecedentes de la invención

En la respuesta inmune adaptativa, se reconocen antígenos extraños por las moléculas receptoras en los linfocitos B (por ejemplo, inmunoglobulinas) y linfocitos T (por ejemplo, receptor de linfocitos T o TCR). Estos antígenos extraños se presentan sobre la superficie de células como fragmentos peptídicos mediante proteínas especializadas, denominadas genéricamente moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Durante una respuesta mediada por células T, los antígenos presentados por las moléculas del MHC se reconocen por un receptor de células T. Sin embargo, para una respuesta inmune eficaz se requiere más que el reconocimiento del receptor de células T del complejo MHC-antígeno. También se requiere la unión de una molécula co-receptora de células T (por ejemplo, CD4 o CD8) a una porción invariable del MHC.

Las células T vienen en varias variedades, incluyendo células T auxiliares y células T citotóxicas. Las células T auxiliares expresan el correceptor CD4 y reconocen los antígenos unidos a moléculas del MHC II. Las células T CD4 + activan otras células efectoras en el sistema inmunológico, por ejemplo, activan las células B que expresan MHC II para producir anticuerpos, activan los macrófagos que expresan MHC II para destruir patógenos, etc. La unión del receptor de CD4 y células T al mismo antígeno extraño presentado por el MHC II hace que una célula T sea significativamente más sensible a ese antígeno.

En cambio, las células T citotóxicas (CTL) expresan el co-receptor CD8 y reconocen antígenos extraños unidos a moléculas del MHC I. Las CTL están especializadas en destruir cualquier célula que lleve un péptido unido al MHC I reconocido por su propio TCR unido a membrana. Cuando una célula muestra péptidos derivados de proteínas celulares no presenta normalmente (por ejemplo, de origen vírico, tumoral o de otro origen no propio), tales péptidos se reconocen mediante los CTL, que se activan y destruyen la célula que muestra el péptido. Similar a CD4, la acción de CD8 hace que las 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, cáncer, enfermedades autoinmunes) los péptidos derivados de algunas autoproteínas se convierten en la diana del componente celular del sistema inmune, lo que resulta en la destrucción de las células que presentan tales péptidos. Ha habido un avance significativo en el reconocimiento de antígenos que son clínicamente significativos (por ejemplo, antígenos asociados a diversos tipos de cáncer). Sin embargo, para mejorar la identificación y la selección de péptidos que provocarán una respuesta adecuada en una célula T humana, en particular, para péptidos de antígenos clínicamente significativos, permanece la necesidad de sistemas *in vivo* e *in vitro* que imiten aspectos del sistema inmune humano. Por lo tanto, existe la necesidad de sistemas biológicos (por ejemplo, células y animales no humanos genéticamente modificados) que puedan mostrar componentes de un sistema inmune humano.

El documento WO03006639 A1 describe una célula animal aislada que comprende al menos un transgén que incluye al menos una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un polipéptido humano implicado en el reconocimiento y/o activación antigénica por células T, que puede usarse en un método para seleccionar compuestos que modulan una respuesta inmune en seres humanos. Vignali et al. describe una quimera de CD4 de ratón/humano que tenía un potente efecto negativo dominante sobre la función de las células T en presencia de concentraciones equimolares de CD4 de tipo silvestre (Vignali (1996) Los dos dominios proximales de membrana de CD4 interactúan con el receptor de células T. Exp. Med. 183(5): 2097-2107).

Sumario de la invención

- Se proporcionan células de roedor modificadas genéticamente que expresan moléculas humanas o humanizadas que funcionan en la respuesta inmune celular de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 4. También se describen loci de roedores humanizados que codifican proteínas correceptoras de células T humanas o humanizadas (por ejemplo, CD4 y/o CD8). Se describen sistemas *in vivo* e *in vitro* que comprenden células de roedor humanizadas, en donde las células de roedor expresan una o más moléculas del sistema inmune humano o humanizado.
- Se divulga en el presente documento un animal no humano genéticamente modificado, que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de co-receptor de células T humano o humanizado. En diversos ejemplos, se proporciona en el presente documento un animal no humano genéticamente modificado, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de co-receptor de células T humano/no humano. En un ejemplo, la secuencia de nucleótidos está presente en un locus co-receptor endógeno de células T. En un ejemplo, una porción humana del polipéptido de co-receptor de células T quimérico comprende todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de un correceptor de células T humanas y el animal no humano expresa un polipéptido de co-receptor de células T quimérico funcional. En un ejemplo, una parte no humana del polipéptido co-receptor de células T quimérico comprende al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un co-receptor de células T no humano y el animal no humano expresa un polipéptido co-receptor de células T quimérico funcional. El polipéptido del co-receptor de células T quimérico se puede expresar solo en las células T del animal no humano, por ejemplo, no se expresa en las células B del animal no humano. El animal no humano puede no expresar un co-receptor funcional de células T no humanas de su locus endógeno de co-receptor de células T no humanas. El polipéptido de co-receptor de células T quimérico puede estar comprendido en la línea germinal del animal no humano. El animal puede comprender en el locus co-receptor de células T endógenas una o dos copias de una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido co-receptor de células T quiméricas; de esta manera, el animal puede ser heterocigoto u homocigoto para la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de co-receptor de células T quimérico.
- De acuerdo con la reivindicación 1, el co-receptor de células T es CD4. Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona una célula de roedor modificado genéticamente que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/roedor quimérico. En una realización, la secuencia de nucleótidos está presente en un locus CD4 endógeno. Por lo tanto, en una realización, se proporciona una célula de roedor modificada genéticamente que comprende en su locus CD4 endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/ratón quimérico, en donde una porción humana del polipéptido CD4 quimérico comprende todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de un polipéptido CD4 humano, en donde una porción de ratón del polipéptido CD4 quimérico comprende al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido de CD4 de ratón, y en donde el ratón expresa un CD4 humano/ratón quimérico funcional. En una realización, se proporciona en el presente documento una célula de ratón modificada genéticamente que comprende en su locus CD4 endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/ratón quimérico, en donde una porción humana del polipéptido quimérico comprende al menos todos o sustancialmente todos los dominios D1-D3 de un polipéptido CD4 humano, en donde una porción de ratón del polipéptido quimérico comprende al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido de CD4 de ratón, y en donde la célula de ratón expresa un CD4 humano/ratón quimérico funcional. En un aspecto, la célula de ratón no expresa un CD4 endógeno funcional a partir de su locus CD4 de ratón endógeno. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/ratón quimérico está enlazada operativamente a un promotor de ratón endógeno y a secuencias reguladoras. En una realización, la porción humana de la proteína CD4 quimérica comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 57. En una realización, el polipéptido CD4 humano/ratón quimérico se expone en la SEQ ID NO: 4.
- Como se divulga en el presente documento, el animal no humano modificado genéticamente, por ejemplo, el ratón genéticamente modificado, que comprende un polipéptido CD4 quimérico, puede comprender además una proteína MHC II humanizada, en donde la proteína MHC II comprende un dominio extracelular de un polipéptido MHC II α humano y un dominio extracelular de un polipéptido MHC II β humano. El animal puede comprender una proteína de MHC II humanizada. En un ejemplo, el animal puede ser un ratón y el ratón puede comprender en el locus del MHC II endógeno (1) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido MHC II α humano/ratón quimérico, en donde una porción humana del polipéptido MHC II α comprende un dominio extracelular de un MHC II α humano y dominios transmembrana y citoplásmicos del polipéptido MHC II α endógeno de ratón, y (2) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC II β humano quimérico/de ratón, en donde una porción humana del polipéptido MHC II β comprende un dominio extracelular de un MHC II β humano, y dominios transmembrana y citoplásmicos del polipéptido MHC II β endógeno de ratón. Los animales no humanos modificados genéticamente, por ejemplo, ratones, que comprenden la secuencia o secuencias de nucleótido que codifican el MHC II quimérico humano/no humano, por ejemplo, humano/ratón, se describen con más detalle en las Solicitudes de Patente de EE.UU. N.º 13/661.116 y 13/793.935. El animal que expresa las proteínas CD4 y/o MHC II humanizadas se puede generar a través de la sustitución de porciones de los genes CD4 y/o MHC II no humanos endógenos, por ejemplo, de ratón, en los loci CD4 y/o MHC II, respectivamente.
- Por lo tanto, también se divulga un método para modificar un locus CD4 de un animal no humano, por ejemplo un roedor, por ejemplo, un ratón, para expresar un polipéptido CD4 humano/ratón quimérico que comprende reemplazar

en un locus CD4 endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 endógeno no humano, por ejemplo, ratón, con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/ratón quimérico. En un ejemplo, el polipéptido CD4 quimérico humano/no humano, por ejemplo, humano/roedor, por ejemplo, humano/ratón, comprende al menos todos o sustancialmente todos los dominios D1-D3 de un polipéptido CD4 humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD4 endógeno no humano, por ejemplo de roedor, por ejemplo, ratón. En un ejemplo, el CD4 humano/ratón quimérico expresado se expone en la SEQ ID NO: 4.

En otro ejemplo, el co-receptor de células T es CD8. Por lo tanto, en el presente documento se divulga un animal no humano modificado genéticamente que comprende una secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido CD8 humano/no humano, por ejemplo, un polipéptido CD8 α y/o CD8 β quimérico humano/no humano. En un ejemplo, la secuencia de nucleótidos está presente en un locus CD8 endógeno. En un ejemplo, el animal es un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata. Por lo tanto, en un ejemplo, se proporciona un ratón modificado genéticamente que comprende en su locus endógeno CD8 (por ejemplo, CD8 α y/o CD8 β endógeno) una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 α humano/ratón quimérico y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 β humano/ratón quimérico, en donde la primera secuencia de nucleótidos comprende una secuencia que codifica todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de un polipéptido CD8 α humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD8 α de ratón, y en donde la segunda secuencia de nucleótidos comprende una secuencia que codifica todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de un polipéptido CD8 β humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD8 β de ratón, en donde el ratón expresa una proteína CD8 humana/ratón quimérica funcional. En un ejemplo, el ratón no expresa un polipéptido CD8 endógeno funcional a partir de su locus CD8 de ratón endógeno. En un ejemplo, la primera secuencia de nucleótidos está unida operativamente al promotor CD8 α de ratón endógeno y las secuencias reguladoras, y la segunda secuencia de nucleótidos está unida operativamente al promotor CD8 β de ratón endógeno y a las secuencias reguladoras. Por lo tanto, en un ejemplo, el ratón no expresa la proteína CD8 quimérica en células B o células T de linaje CD4. En un ejemplo, la porción humana del polipéptido CD8 α y/o β quimérico comprende un dominio similar a la inmunoglobulina V del CD8 α humano y/o el polipéptido β . En un ejemplo, una porción humana del polipéptido CD8 α humano/ratón quimérico comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 59. En un ejemplo, una porción humana del polipéptido CD8 β humano/ratón quimérico comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 58. En un ejemplo, el polipéptido CD8 α humano/ratón quimérico se expone en la SEQ ID NO: 54, y el polipéptido CD8 β humano/ratón quimérico se expone en la SEQ ID NO: 53.

En un ejemplo, el animal no humano modificado genéticamente, por ejemplo, el ratón genéticamente modificado, que comprende los polipéptidos CD8 α y/o β quiméricos descritos en el presente documento comprende además una proteína MHC I humana o humanizada, en donde la proteína MHC I comprende un dominio extracelular de un polipéptido MHC I humano. En un ejemplo, el animal comprende un complejo de MHC I humanizado. Por lo tanto, el animal puede comprender una proteína MHC I humanizada y un polipéptido de microglobulina β 2 humana o humanizada. En un ejemplo, el animal es un ratón y el ratón comprende en el locus del MHC I endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del MHC I humano/ratón quimérico, en donde una porción humana del polipéptido MHC I comprende un dominio extracelular de un polipéptido MHC I humano, y dominios transmembrana y citoplásmicos del polipéptido MHC I de ratón endógeno; y el animal también comprende en un locus de β 2 microglobulina endógena una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de β 2 microglobulina humano o humanizado. Los animales no humanos modificados genéticamente, por ejemplo, ratones, que comprenden una secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican MHC I y β 2 microglobulina quiméricos humano/no humano, por ejemplo, humano/ratón, se describen con más detalle en las Solicitudes de Patente de EE.UU. N.º 13/661.159 y 13/793.812. En un ejemplo, el animal que expresa la proteína o proteínas CD8, MHC I, y/o β 2 microglobulina humanizadas se genera a través de la sustitución de porciones de genes de CD8, MHC I y/o microglobulina β 2 endógenos no humanos, por ejemplo, de ratón, en los loci CD8, MHC I y/o microglobulina β 2, respectivamente.

Por lo tanto, también se divulga un método para modificar un locus CD8 de un animal no humano, por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón, para expresar un polipéptido CD8 humano/ratón quimérico que comprende reemplazar en un locus CD8 endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 no humano endógeno, por ejemplo, de ratón, con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 humano/ratón quimérico. En un ejemplo, el polipéptido CD8 se selecciona del grupo que consiste en CD8 α y CD8 β , y una combinación de los mismos. En una realización, el polipéptido quimérico CD8 (CD8 α y/o CD8 β) humano/ratón; comprende todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de un polipéptido CD8 humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD8 no humano endógeno, por ejemplo, de ratón.

Se proporcionan también en el presente documento células de roedor modificadas genéticamente de acuerdo con la reivindicación 1, por ejemplo, células T, derivadas de los roedores (por ejemplo, ratones o ratas) descritos en el presente documento. Se divulgan también tejidos y embriones derivados de animales no humanos divulgados en el presente documento.

Cualquiera de las realizaciones, ejemplos y aspectos descritos en el presente documento pueden usarse juntos entre sí, salvo que se indique otra cosa o sea evidente a partir del contexto. Otras realizaciones serán evidentes para un experto en la materia a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada. La siguiente descripción detallada incluye representaciones a modo de ejemplo de las diversas realizaciones de la invención, que no son restrictivas de

la invención como se reivindica. Las figuras acompañantes constituyen una porción de la presente memoria descriptiva y, junto con la descripción, sirven únicamente para ilustrar las realizaciones y no limitar la invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática (no a escala) de la estrategia para generar un locus CD4 humanizado. La secuencia de los exones 3-6 del ratón, empezando justo después del péptido señal, se reemplazó primero con la secuencia del exón 3 humano en dirección 3 del péptido señal (parte superior) y, posteriormente, los exones 4-6 humanos se insertaron en dirección del exón 3 humano mediante la digestión/ligación de restricción.

La Figura 2 muestra el análisis FACS con anticuerpos anti-CD4 humanos y anti-CD4 de ratón de esplenocitos derivados de ratón TS o heterocigoto de ratón para CD4 humano (1766HET) (A); y análisis FACS de células T derivadas de ratón TS frente a ratón 1766HET frente a línea de células T CD4 humanas Jurkat.

La Figura 3 es una representación esquemática (no a escala) de la estrategia para generar un locus CD8b humanizado (MAID 1737) mediante la sustitución de exones 2-3 de CD8 β de ratón por exones 2-3 de CD8 β humanos. Las secuencias de exones del ratón están representadas por rectángulos rellenos, las secuencias de exones humanos están representadas por rectángulos sombreados.

La Figura 4 es una representación esquemática (no a escala) de la estrategia para generar un locus CD8a humanizado (MAID 1738) mediante el reemplazo de una porción del exón 1 y el exón 2 del ratón con exones humanos 2-3, reteniendo la secuencia líder del ratón al comienzo del exón 1. Las secuencias de exones del ratón están representadas por rectángulos rellenos, las secuencias de exones humanos están representadas por rectángulos sombreados.

La Figura 5 es una representación esquemática (no a escala) de la estrategia de direccionamiento secuencial para generar loci humanizados que comprenden la secuencia que codifica los genes CD8b y CD8a humanizados. Las secuencias de exones del ratón están representadas por rectángulos rellenos, las secuencias de exones humanos están representadas por rectángulos sombreados.

La Figura 6 es un análisis FACS con cualquiera de los anticuerpos CD8b de ratón, CD8a de ratón, CD8b humano, o CD8a humano de los esplenocitos de ratón TS o heterocigoto de ratón tanto para CD8b como para CD8a humanos, con casetes de selección retirados (1739 Het, 1740 Het).

La Figura 7 es un análisis FACS con cualquiera de CD8b de ratón, CD8a de ratón, CD8b humano, CD8a humano o CD4 de timocitos obtenidos con ratones TS o 1739HET/1740HET (ratones heterocigotos para CD8b y CD8a).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

La presente invención proporciona células de roedor genéticamente modificadas (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, etc.) que expresan polipéptidos de co-receptor de células T humanizadas de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 4 y embriones y tejidos de roedor que comprenden los mismos. Salvo que se defina de otro modo, todos los términos y frases usados en el presente documento incluyen los significados que los términos y las frases han adquirido en la técnica, salvo que se indique claramente lo contrario o sea claramente evidente a partir del contexto en el que se usa el término o frase.

El término "conservativa", cuando se usa para describir una sustitución conservativa de aminoácido, incluye la sustitución de un resto de aminoácido por otro resto de aminoácido que tiene un grupo R de la cadena secundaria con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). Pueden conseguirse sustituciones conservativas de aminoácidos modificando una secuencia de nucleótidos con el fin de introducir un cambio de nucleótidos que codificará la sustitución conservativa. En general, una sustitución conservativa de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de interés de una proteína, por ejemplo, la capacidad de CD4 o CD8 para unirse a MHC II o MHC I, respectivamente, y aumentar la sensibilidad del TCR al antígeno presentado por 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 hidroxil 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 sustitución de aminoácidos conservativa incluyen, por ejemplo, valina/leucina/isoleucina, fenilalanina/arginina, lisina/arginina, alanina/valina, glutamato/aspartato y asparagina/glutamina. En algunas realizaciones, una sustitución de aminoácidos conservativa puede ser una sustitución de cualquier resto nativo en una proteína con alanina, como se usa en, por ejemplo, la mutagénesis por barrido de alanina. En algunas realizaciones, se realiza una sustitución conservativa que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad de registro PAM250 descrita en Gonnet et al. ((1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256:1443-45). En algunas realizaciones, la sustitución es una sustitución moderadamente conservativa en donde la sustitución tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

Por lo tanto, en el presente documento también se divulga un animal no humano modificado genéticamente cuyo genoma comprende (por ejemplo, en un locus endógeno) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de

co-receptor de células T humanizado (por ejemplo, polipéptido CD4 o CD8), en donde el polipéptido comprende sustituciones conservativas de aminoácidos de la secuencia o secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento.

- 5 Un experto en la materia entenderá que en la adición a los restos de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos del co-receptor de células T humanizados descritos en el presente documento, debido a la degeneración del código genético, otros ácidos nucleicos pueden codificar los polipéptidos de la divulgación. Por tanto, además de un animal no humano modificado genéticamente que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido del co-receptor de células T (por ejemplo, el polipéptido CD4 o CD8) con sustituciones de aminoácidos conservativas, también se divulga un animal no humano cuyo genoma comprende una secuencia de nucleótidos que difiere de la descrita en el presente documento debido a la degeneración del código genético.

15 El término "identidad", cuando se usa junto con secuencia incluye identidad como se determina mediante numerosos algoritmos diferentes conocidos en la técnica que se pueden usar para medir la identidad de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, las identidades se determinan usando una alineación ClustalW v. 1.83 (lenta) empleando una penalización de hueco abierto 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 N terminal a su C terminal. En diversos ejemplos cuando se compara una secuencia humana/no humana quimérica con una secuencia humana, la porción humana de la secuencia humana/no humana quimérica (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 humana/no humana quimérica (por ejemplo, comparando un ectodominio humano de una proteína humana/de ratón quimérica con un ectodominio humano de una proteína humana).

30 Los términos "homología" u "homólogo" en referencia a las secuencias, por ejemplo, nucleótidos o secuencias de aminoácidos, significan dos secuencias que, tras el alineamiento y la comparación óptimos, son idénticos en, 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 óptimo del gen, la construcción directora debe contener brazos homólogos a secuencias de ADN endógenas (es decir, "brazos de homología"); de esta manera, se puede producir la recombinación homóloga entre la construcción de direccionamiento y la secuencia endógena dirigida.

35 La frase "unido operativamente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos de esta manera están en una relación que les permite funcionar en su manera prevista. Así pues, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína puede unirse operativamente a secuencias reguladoras (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencia silenciadora, etc.) con el fin de retener la regulación de la transcripción adecuada. Además, diversas porciones de una proteína quimérica o humanizada de la divulgación pueden unirse operativamente para retener el plegamiento, el procesamiento, la dirección y la expresión adecuadas, y otras propiedades funcionales de la proteína en la célula. A menos que se indique otra cosa, diversos dominios de las proteínas quimérica o humanizada de la divulgación se unen operativamente entre sí.

45 El término "reemplazo", en referencia al reemplazo génico se refiere a colocar material genético exógeno en un locus genético endógeno, reemplazando de esta manera la totalidad o una porción del gen endógeno con una secuencia de ácido nucleico ortóloga u homóloga. Como se demuestra en los Ejemplos siguientes, las secuencias de ácido nucleico de loci endógenos que codifican porciones de CD4 o CD8 (CD8 α y/o CD8 β) de ratón fueron reemplazadas por secuencias de nucleótidos que codifican porciones de polipéptidos CD4 o CD8 (CD8 α y/o CD8 β) humanos, respectivamente.

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

60 Varios aspectos descritos a continuación para los animales no humanos CD4 modificados genéticamente, por ejemplo, tipo de animal; cepas de animales; tipos celulares; selección, detección y otros métodos; métodos de uso; etc., será aplicable a los animales CD8 genéticamente modificados.

Células y animales CD4 modificados genéticamente

65 La invención generalmente proporciona células de roedor modificadas genéticamente que comprenden en su genoma, por ejemplo, en un locus CD4 endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humanizado; de esta manera, los animales expresan un polipéptido CD4 humanizado.

El gen CD4 humano se localiza en el cromosoma 12 y se cree que contiene 10 exones. El gen CD4 codifica una proteína con secuencia de señal hidrofóbica amino-terminal, codificada por los exones 2 y 3 del gen. La proteína comprende 4 dominios de tipo inmunoglobulina, conocidos comúnmente como 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, mientras que D2, D3 y D4 están codificados por un exón separado cada uno - los exones 5, 6 y 7, 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., *supra*. En áreas de alta concentración de proteínas, tales como el área de contacto entre la célula T y la célula presentadora de antígeno, 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 a 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 co-receptor de células T CD4 en la grieta hidrofóbica 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 co-receptor de CD4 interactúan con el complejo TCR-CD3, ya que la sustitución de estos dos dominios anuló la capacidad de CD4 para 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 CD4 codifica el dominio transmembrana, mientras que el resto del gen codifica el dominio citoplásmico. El dominio citoplásmico CD4 posee muchas funciones distintas. Por ejemplo, el dominio citoplásmico de CD4 recluta una tirosina quinasa Lck. Lck es una quinasa de la familia Src que está asociada a los dominios citoplásmicos CD4 y CD8 y la unión simultánea de los co-receptores y TCR al mismo MHC da lugar a un aumento de la fosforilación de tirosina de las cadenas CD3 y α del complejo TCR, lo que a su vez conduce al reclutamiento de otros factores que juegan un papel en la activación de las células T. Itano y colaboradores han propuesto que la cola citoplásmica de CD4 también promueve la diferenciación de las células T CD4+CD8+ en el linaje CD4+ mediante el diseño y prueba de la expresión de la proteína híbrida que comprende el dominio extracelular CD8 y la cola citoplásmica 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 células T específicas de MHC I de linaje CD4. *Id.* El co-receptor CD4 parece ser el principal receptor del virus del VIH, siendo el agotamiento de las células T CD4+ un indicador del avance de la enfermedad. La cola citoplásmica de CD4 parece ser esencial para transmitir la señal apoptótica a las células T CD4+ en la apoptosis inducida por el VIH. Específicamente, la interacción de CD4 y Lck demostró potenciar 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.

Las células T se desarrollan en el timo progresando desde timocitos inmaduros CD4-/CD8- (doble negativo o DN) a timocitos CD4+/CD8+ (doble positivo o DP), que finalmente experimentan una selección positiva para convertirse en células T CD4+ o CD8+ (solo positivo o SP). Los timocitos DP que reciben señales a través del TCR restringido por MHC I se diferencian en células T CD8+, mientras que los timocitos DP que reciben señales a través de TCR restringido por MHC II se diferencian en células T CD4+. Las señales recibidas por la célula DP que conducen a su diferenciación en CD4+ de células T CD8+ han sido objeto de numerosas investigaciones. 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 co-receptor de células T específico como resultado de una selección positiva es un producto de la regulación transcripcional. Para CD4, se ha demostrado que un potenciador ubicado 13 kb en sentido ascendente del exón 1 de CD4 regula la expresión de CD4 en células 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 transcripcional que actúa *cis* situado dentro del primer intrón del gen CD4 murino funciona para silenciar la expresión de CD4 en células distintas de las células T CD4+. Siu et al. (1994) A transcriptional silencer control the developmental expression of the CD4 gene, EMBO J. 13:3570-3579.

Debido a los 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 desarrollados previamente que expresan CD4 humano, estos ratones no pudieron recapitular el desarrollo del linaje de células T normales y produjeron células inmunes distintas de las células 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 células T CD8+ y células B); Fugger et al. (1994) Expression of HLA-DR4 and human CD4 transgenes in mice determines the variable region β -chain T-cell repertoire and mediates an HLA-D-restricted immune response, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 91:6151-55 (CD4 expresado en todos los timocitos CD3+ y células B). Por lo tanto, en un ejemplo, puede haber un beneficio en el desarrollo de un animal modificado genéticamente que retenga el promotor endógeno del ratón y otros elementos reguladores para que el animal produzca células T que sean capaces de experimentar el desarrollo normal de las células T y la elección del linaje.

En el presente documento se divulga un animal no humano genéticamente modificado que comprende, por ejemplo, en su locus endógeno de co-receptor de células T (por ejemplo, locus de CD4), una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido correceptor de células T humano/no humano quimérico. En un ejemplo, una porción humana del polipéptido quimérico comprende todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de un co-receptor de células T humanas. En un ejemplo, una porción no humana del polipéptido quimérico comprende dominios transmembrana y citoplásmicos de un co-receptor de células T no humanas. En un ejemplo, el animal no humano expresa un polipéptido de co-receptor de células T quimérico funcional. Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un animal no humano modificado genéticamente que comprende en su locus CD4 endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/no humano quimérico, en donde una porción humana del polipéptido quimérico comprende todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de un CD4 humano, en donde una porción no humana comprende al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un CD4 no humanos, y en donde el animal expresa un polipéptido de CD4 quimérico funcional. En un ejemplo, el animal no humano solo expresa el polipéptido CD4 humanizado, es decir, el polipéptido de CD4 humano/no humano quimérico, y no expresa una proteína CD4 no humana endógena funcional desde su locus CD4 endógeno.

En una realización, la porción humana del polipéptido CD4 humano/roedor quimérico comprende todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de un polipéptido CD4 humano. En otra realización, el polipéptido CD4 humano/roedor quimérico comprende al menos todo o sustancialmente todo el dominio de unión a MHC II (por ejemplo, una porción sustancial de los dominios D1 y D2) del polipéptido CD4 humano; en una realización, la porción humana del polipéptido CD4 humano/roedor quimérico comprende todo o sustancialmente todo de los dominios D1, D2 y D3 del polipéptido CD4 humano; en otra realización más, la porción humana del polipéptido CD4 humano/roedor quimérico comprende todos o sustancialmente todos los dominios de inmunoglobulina de CD4, por ejemplo, los dominios denominados D1, D2, D3 y D4. En otra realización más, la porción humana del polipéptido CD4 humano/roedor quimérico 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 células T. En otra realización más, la porción humana del polipéptido CD4 humano/roedor quimérico comprende toda o sustancialmente toda la porción extracelular de la CD4 humana que es responsable de interactuar con el MHC II y/o el dominio variable de un receptor de células T. Por lo tanto, en una realización, secuencia de nucleótidos que codifica la porción humana del polipéptido CD4 quimérico comprende toda o sustancialmente toda la secuencia codificante de los dominios D1-D2 de CD4 humana (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 de codificación de D1-D3 del CD4 humano (por ejemplo, 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 humano/roedor quimérico comprende secuencias de nucleótidos que codifican todos o sustancialmente todos los dominios D1-D3 del CD4 humano. En otra realización, la secuencia de nucleótidos que codifica la porción humana del polipéptido CD4 quimérico comprende la secuencia codificante de los dominios D1-D4 del gen CD4 humano. En otra realización, la secuencia de nucleótidos puede comprender la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido señal CD4 del ratón, por ejemplo, la región codificada por porciones de 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 CD4 humano. En una realización, el polipéptido CD4 humano/roedor quimérico comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 y la porción humana del polipéptido quimérico se extiende aproximadamente en los aminoácidos 27-319 de la SEQ ID NO: 4 (expuesta por separado en la SEQ ID NO: 57).

En un ejemplo, el animal no humano expresa una secuencia de polipéptido CD4 humano/no humano quimérico. En un ejemplo, una porción humana de la secuencia de CD4 quimérica comprende una o más modificaciones conservativas o no conservativas.

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

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 toda la secuencia generalmente incluye el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de los aminoácidos que se cree 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 la alineación y los métodos de predicción de dominio usados.

En un ejemplo, la porción no humana del polipéptido CD4 humano/no humano quimérico comprende al menos dominios transmembrana y citoplásmicos del polipéptido CD4 no humanos. Debido a las funciones importantes servidas por el dominio citoplásmico CD4, la retención de la secuencia no humana endógena (por ejemplo, ratón) en animales genéticamente diseñados asegura la preservación de la señalización intracelular adecuada y otras funciones del co-receptor. En un ejemplo, el animal no humano es un ratón y el polipéptido CD4 no humano es un polipéptido 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, secuencia que comprende sustituciones de aminoácidos conservativas/no conservativas, se abarca en el presente documento. En una realización, la porción no humana del co-receptor de CD4 quimérico comprende cualquier secuencia del CD4 endógeno que no se ha humanizado.

El animal no humano descrito en el presente documento puede comprender en su locus endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/no humano quimérico. En un ejemplo, esto da como resultado un reemplazo de una porción de un gen CD4 endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica una porción de un polipéptido CD4 humano. En un ejemplo, dicha sustitución es una sustitución de la secuencia de nucleótidos endógena que codifica, por ejemplo, todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de un CD4 no humano, por ejemplo, una secuencia que codifica al menos todo o sustancialmente todo el primer dominio de tipo inmunoglobulina (es decir, D1) de un CD4 no humano (por ejemplo, una secuencia que codifica todos o sustancialmente todos los dominios D1-D2 de un CD4 no humano, por ejemplo, una secuencia que codifica todos o sustancialmente todos los dominios D1-D3 de un CD4 no humano, por ejemplo, una secuencia que codifica todos o sustancialmente todos los dominios D1-D4 de un CD4 no humano), con una secuencia de nucleótidos humana que codifica el mismo. En un ejemplo, el reemplazo da como resultado una proteína quimérica que comprende la secuencia de CD4 humana que es responsable de la interacción con el MHC II y/o la porción extracelular de un receptor de células T. En otro ejemplo más, el reemplazo da como resultado una proteína quimérica que comprende la secuencia de CD4 humana que es responsable de la interacción con el MHC II y/o el dominio variable de un receptor de células T. En un ejemplo, el reemplazo no comprende un reemplazo de una secuencia de CD4 que codifica al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido de CD4 no humano. Por lo tanto, en un ejemplo, el animal no humano expresa un polipéptido CD4 humano/no humano quimérico del locus CD4 de roedor endógeno. En otro ejemplo más, el reemplazo da como resultado una proteína que comprende una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 4.

En una realización, se proporciona la secuencia de nucleótidos del locus CD4 humano/roedor quimérico (por ejemplo, locus CD4 humano/ratón quimérico) descrito en el presente documento. En un aspecto, debido a que la secuencia de CD4 humano/roedor quimérica, por ejemplo, humano/ratón, se coloca en el locus CD4 del roedor endógeno (por ejemplo, ratón), retiene el elemento potenciador de CD4 ubicado en dirección 5' del primer exón de CD4. En una realización, el reemplazo en el locus CD4 de roedor endógeno (por ejemplo, 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 CD4; de esta manera, en un aspecto, el locus CD4 quimérico retiene el silenciador que actúa en *cis* situado en el intrón 1 del gen CD4 de roedor (por ejemplo, ratón). Por lo tanto, en una realización, el locus quimérico retiene el promotor CD4 de roedor endógeno (por ejemplo, de ratón) y los elementos reguladores. 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 células T CD4+, la elección de linaje CD4 y la función de co-receptor. Por lo tanto, en algunos ejemplos, los animales de la divulgación comprenden una modificación genética que no altera la elección adecuada del linaje y el desarrollo de células T. En un ejemplo, los animales (por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratones) de la divulgación no expresan el polipéptido CD4 quimérico en células inmunes distintas de las células que normalmente expresan CD4. En un ejemplo, los animales no expresan CD4 en células B o células T CD8+ SP. En un ejemplo, el reemplazo da como resultado la retención de elementos que permiten una regulación espacial y temporal adecuada de la expresión de CD4.

El animal no humano modificado genéticamente de la divulgación se puede seleccionar de un grupo que consiste en un ratón, rata, conejo, cerdo, bovino (por ejemplo, vaca, toro, búfalo), ciervo, oveja, cabra, pollo, gato, perro, hurón, primate (por ejemplo, tití, mono rhesus). Para los animales no humanos en los que no se dispone fácilmente de células ES modificables genéticamente adecuadas, se emplean otros métodos para fabricar un animal no humano que incluye 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 transferencia nuclear para transferir el genoma modificado a una célula adecuada, por ejemplo, un ovocito, y gestar la célula modificada (por ejemplo, el ovocito modificado) en un animal no humano en condiciones adecuadas para formar un embrión.

En un ejemplo, el animal no humano es un mamífero. En un ejemplo, el animal no humano es un mamífero pequeño, por ejemplo, de la superfamilia Dipodoidea o Muroidea. En un ejemplo, el animal modificado genéticamente es un roedor. En un ejemplo, el roedor se selecciona de un ratón, una rata y un hámster. En un ejemplo, el roedor se selecciona de la superfamilia Muroidea. En un ejemplo, el animal genéticamente modificado es de una familia seleccionada de Calomyscidae (por ejemplo, hámsteres similares a ratones), Cricetidae (por ejemplo, hámster, ratas y ratones del nuevo mundo, campañoles), Muridae (ratones y ratas auténticos, jerbos, ratones espinosos, ratas con cresta), Nesomyidae (ratones trepadores, ratones de abazón de las rocas, ratas coliblancas, ratas y ratones de

Madagascar), Platanthomyidae (por ejemplo, liron espinoso), y Spalacidae (por ejemplo, ratas topo, ratas del bambú, y zokores). En un ejemplo específico, el roedor genéticamente modificado se selecciona de un ratón o rata auténticos (familia Muridae), un jerbo, un ratón espinoso y una rata con cresta. En un ejemplo, el ratón genéticamente modificado es un miembro de la familia Muridae. En un ejemplo, el animal es un roedor. En un ejemplo específico, el roedor se selecciona de un ratón y una rata. En un ejemplo, el animal no humano es un ratón.

En un ejemplo específico, el animal no humano es un roedor que es un ratón de una cepa C57BL seleccionada de C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr y C57BL/Ola. En otro ejemplo, el ratón es una cepa 129 seleccionada 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, Resting *et al.* (1999) Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome 10:836, véase también Auerbach *et al.* (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines). En un ejemplo específico, el ratón modificado genéticamente es una mezcla de una cepa 129 anteriormente mencionada y una cepa C57BL/6 anteriormente mencionada. En otro ejemplo específico, el ratón es una mezcla de las cepas 129 anteriormente mencionadas, o una mezcla de las cepas BL/6 anteriormente mencionadas. En un ejemplo específico, la cepa 129 de la mezcla es una cepa 129S6 (129/SvEvTac). En otro ejemplo, el ratón es una cepa BALB, por ejemplo, cepa BALB/c. En otra realización más, el ratón es una mezcla de una cepa BALB y otra cepa anteriormente mencionada.

En un ejemplo, el animal no humano es una rata. En un ejemplo, la rata se selecciona de una rata Wistar, una cepa LEA, una cepa Sprague Dawley, una cepa Fischer, F344, F6 y Dark Agouti. En un ejemplo, 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 el presente documento se proporciona un ratón modificado genéticamente que comprende en su genoma, por ejemplo, en su locus CD4 endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/ratón quimérico, en donde una porción de ratón del polipéptido quimérico comprende al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido de CD4 de ratón, y en donde el ratón expresa un CD4 humano/ratón quimérico. En un ejemplo, una porción humana del polipéptido quimérico comprende al menos todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de un polipéptido CD4 humano. En un ejemplo, una porción humana del polipéptido quimérico comprende al menos todos o sustancialmente todos del dominio D1 de una proteína de CD4 humana. En un ejemplo, una porción humana del polipéptido quimérico comprende al menos todos o sustancialmente todos los dominios D1-D2 de una proteína CD4 humana, por ejemplo, al menos todos o sustancialmente todos los dominios D1-D3 de una proteína CD4 humana, por ejemplo, todos o sustancialmente todos los dominios D1-D4 de una proteína CD4 humana. Por lo tanto, en un ejemplo, el ratón comprende en el locus CD4 endógeno una secuencia de nucleótidos que comprende al menos todos o sustancialmente todos los exones 4, 5 y 6 del gen CD4 humano, por ejemplo, la secuencia del exón 3 del gen CD4 humano que codifica una parte del dominio D1 de CD4 humano y los exones 4-6 del gen CD4 humano. En un ejemplo, el ratón comprende en el locus CD4 endógeno un CD4 humano/ratón quimérico 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 células T. En otro ejemplo, el ratón comprende en el locus CD4 endógeno un CD4 humano/ratón quimérico 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 células T. En un ejemplo, la secuencia de nucleótidos comprende la secuencia que codifica el péptido señal de CD4 de ratón. En un ejemplo, el ratón comprende una sustitución 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 otro ejemplo, el ratón comprende un reemplazo de la secuencia de nucleótidos que codifica al menos todo o sustancialmente todo el dominio CD4 D1 del ratón, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica al menos todos o sustancialmente todos los dominios D1-D2 de CD4 de ratón, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica al menos todos o sustancialmente todos los dominios D1-D3 de CD4 de ratón, codificando la secuencia de nucleótidos humana el mismo. En un ejemplo, el ratón no expresa un CD4 endógeno funcional a partir de su locus CD4 de ratón endógeno. En un ejemplo, el ratón descrito en el presente documento comprende la secuencia de nucleótidos CD4 humano/ratón quimérico en la línea germinal del ratón. En un ejemplo, el ratón conserva cualquier secuencia endógena que no haya sido humanizada, por ejemplo, en la realización en donde el ratón comprende un reemplazo de la secuencia de nucleótidos que codifica todos o sustancialmente todos los dominios D1-D3, el ratón conserva la secuencia de nucleótidos endógena que codifica el dominio CD4 D4 del ratón, así como una secuencia de nucleótidos que codifica los dominios transmembrana y citoplásmico de la CD4 del ratón.

En un ejemplo, el ratón que expresa la proteína CD4 humana/ratón quimérica retiene el promotor CD4 del ratón y las secuencias reguladoras, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos en el ratón que codifica el CD4 humano/ratón quimérico está unida operativamente al promotor CD4 de ratón endógeno y a las secuencias reguladoras. En un ejemplo, estas secuencias reguladoras de ratón retenidas en el animal manipulado genéticamente de la invención incluyen las secuencias que regulan la expresión de la proteína quimérica en etapas apropiadas durante el desarrollo de células T. Por lo tanto, en un ejemplo, el ratón no expresa CD4 quimérico en células B o células T de linaje CD8. En un ejemplo, el ratón tampoco expresa CD4 quimérico en ningún tipo de célula, por ejemplo, cualquier tipo de célula inmune, que normalmente no expresa CD4 endógeno.

En diversos ejemplos, un animal no humano (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata) que expresa una proteína CD4 quimérica funcional de un locus CD4 quimérico como se describe en el presente documento muestra la proteína quimérica en una superficie celular, por ejemplo, superficie de las células T. En un ejemplo, el roedor expresa la proteína CD4 quimérica sobre una superficie celular en una distribución celular que es la misma que se observa en un humano. En un ejemplo, la proteína CD4 de la invención 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).

En un ejemplo, el animal no humano (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, ratón) de la invención 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 una célula 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 antígeno. En un ejemplo, la proteína MHC II comprende un dominio extracelular de un polipéptido MHC II α humano y un dominio extracelular de un polipéptido MHC II β humano. Algunos animales modificados genéticamente a modo de ejemplo que expresan un polipéptido MHC II humano o humanizado se describen en la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 13/661.116, presentada el 26 de octubre de 2012 y en la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 13/793.935, presentada el 11 de marzo de 2013. Por lo tanto, en un ejemplo, 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 MHC II α humanizado que comprende un dominio extracelular MHC II α humano y dominios transmembrana y citoplásmicos de un MHC II endógeno, por ejemplo, de ratón, en donde el dominio extracelular α de MHC II humano comprende los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de un MHC II α humano y (2) un polipéptido humanizado de MHC II β que comprende un dominio extracelular β de MHC II humano y dominios transmembrana y citoplásmico de un MHC II endógeno, por ejemplo, de ratón, en donde el dominio extracelular del MHC II β humano comprende los dominios $\beta 1$ y $\beta 2$ de un MHC II β humano. En un ejemplo, ambos polipéptidos MHC II α y β humanizados están codificados por secuencias de nucleótidos ubicadas en los loci α y β MHC II endógenos, respectivamente; en un aspecto, el animal no expresa polipéptidos α y β funcionales de MHC II. Por lo tanto, El MHC II expresado por los animales puede ser una proteína MHC II quimérica humana/no humana, por ejemplo, humana/roedor (por ejemplo, humana/ratón). Una porción humana de la proteína MHC II quimérica puede derivar de una proteína HLA de clase II 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 HLA de clase II presente en una población humana. En el ejemplo, en donde el animal es un ratón, una porción no humana (es decir, un ratón) del polipéptido MHC II quimérico puede derivar de una proteína MHC II de ratón seleccionada de H-2E y H-2A. En un ejemplo, el animal no humano que comprende un CD4 humano/no humano quimérico y el MHC II humanizado descrito en las Solicitudes de Patente de EE.UU. N.º 13/661.116 y 13/793.935 pueden generarse criando un animal que comprende un locus CD4 quimérico como se describe en el presente documento con un animal que comprende un locus MHC II humanizado. El animal también puede generarse introduciendo en células ES de un animal que comprende el locus MHC II humanizado una secuencia de nucleótidos que codifica CD4 quimérico, por ejemplo, para el reemplazo en el locus CD4 endógeno; o la introducción en células ES de un animal que comprende un locus CD4 quimérico una secuencia de nucleótidos que codifica MHC II humanizado.

En un ejemplo, el animal no humano modificado genéticamente (por ejemplo, el ratón) que comprende tanto CD4 humano/roedor quimérico como MHC II humano o humanizado puede comprender una o dos copias de los genes que codifican estas proteínas; de esta manera, el animal puede ser heterocigoto u homocigoto para los genes que codifican CD4 y MHC II quiméricos (es decir, MHC II α y/o MHC II β), respectivamente.

Además de un animal no humano modificado genéticamente, también se divulga un embrión no humano (por ejemplo, de roedor, por ejemplo, un embrión de ratón o un embrión de rata), en donde el embrión comprende una célula ES donante obtenida a partir de un animal no humano (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata) como se describe en el presente documento. En un ejemplo, el embrión comprende una célula ES donante que comprende el gen CD4 quimérico, y células embrionarias huésped.

También se divulga un tejido, en donde el tejido se obtiene a partir de un animal no humano (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata) como se describe en el presente documento, y expresa la proteína CD4 quimérica.

Además, se proporciona una célula de roedor modificada genéticamente aislada de un roedor como se describe en el presente documento. En una realización, la célula es una célula ES. En una realización, la célula es una célula T, por ejemplo, una célula T CD4+. En una realización, la célula es una célula T auxiliar (célula TH). En una realización, la célula TH es una célula TH efectora, por ejemplo, una célula TH1 o una célula TH2.

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

En un ejemplo, se proporciona una célula pluripotente inducida no humana que comprende un gen que codifica un polipéptido CD4 quimérico como se describe en el presente documento. En un ejemplo, la célula pluripotente inducida

se obtiene a partir de un animal no humano como se describe en el presente documento.

En un ejemplo, se proporciona un hibridoma o cuadroma obtenido a partir de una célula de un animal no humano como se describe en el presente documento. En un ejemplo, el animal no humano es un ratón o una rata.

En un ejemplo, se proporciona una preparación *in vitro* que comprende una célula T que lleva una proteína CD4 quimérica en su superficie y una segunda célula que se une a la CD4 quimérica. En un ejemplo, la segunda célula es una célula, por ejemplo, una APC, que expresa un polipéptido MHC II, por ejemplo, una proteína MHC II quimérica humana/no humana. En un ejemplo, el CD4 quimérico en la superficie de la primera célula interactúa con el CMH II quimérico en la superficie de la segunda célula. En un ejemplo, la proteína CD4 quimérica conserva la interacción con moléculas citosólicas endógenas, por ejemplo, moléculas de señalización citosólicas endógenas (por ejemplo, Lck endógena, etc.).

También se proporciona un método para fabricar un animal no humano modificado genéticamente (por ejemplo, un roedor modificado genéticamente, por ejemplo, un ratón o una rata) descrito en el presente documento. En un ejemplo, el método para fabricar un animal no humano modificado genéticamente da como resultado el animal que comprende en un locus CD4 endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/no humano quimérico. En algunos ejemplos, el método utiliza una construcción directora preparada utilizando la tecnología VELOCIGENE®, introduciendo la construcción en las células ES, e introduciendo los clones de células ES dirigidas en un embrión de ratón utilizando la tecnología VELOCIMOUSE®, como se describe en los Ejemplos.

En un ejemplo, la invención comprende un método para modificar un locus CD4 de un animal no humano para expresar un polipéptido CD4 humano/no humano quimérico descrito en el presente documento. En un ejemplo, la invención proporciona un método para modificar un locus CD4 de un ratón para expresar un polipéptido CD4 humano/ratón quimérico que comprende reemplazar en un locus CD4 endógeno de un ratón una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 de ratón endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido humano/ratón quimérico CD4. El polipéptido CD4 humano/ratón quimérico puede comprender todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de un polipéptido CD4 humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD4 de ratón endógeno. El polipéptido CD4 humano/ratón quimérico comprende todos o sustancialmente todos los dominios D1-D2 de un polipéptido CD4 humano. En otro ejemplo más, el polipéptido CD4 humano/ratón quimérico comprende todos o sustancialmente todos los dominios D1-D3 de un polipéptido CD4 humano. En otro ejemplo más, el polipéptido CD4 humano/ratón quimérico comprende toda o sustancialmente toda la secuencia de aminoácidos de CD4 humano que es responsable de la interacción con MHC II y/o un dominio extracelular de un receptor de células T. En otra realización más, el polipéptido CD4 humano/ratón quimérico comprende toda o sustancialmente toda la secuencia de aminoácidos de CD4 humano que es responsable de la interacción con MHC II y/o un dominio variable de un receptor de células T.

Por lo tanto, también se proporciona una construcción de nucleótidos para generar los animales modificados genéticamente descritos en el presente documento. En un ejemplo, la secuencia de nucleótidos comprende brazos de homología 5' y 3', un fragmento de ADN que comprende secuencia genética de CD4 humano (por ejemplo, secuencia genética de dominio extracelular de CD4 humano, por ejemplo, secuencia genética de todos o sustancialmente todos los dominios D1-D2 de CD4 humano, por ejemplo, secuencia genética de todos o sustancialmente todos los dominios D1-D3 y/o D2-D3 de CD4 humano, por ejemplo, secuencia genética de todos o sustancialmente todos los dominios D1-D4 de CD4 humano), y un casete de selección flanqueado por sitios de recombinación. En una realización, la secuencia genética de CD4 humano es una secuencia genómica que comprende intrones y exones de CD4 humano. En un ejemplo, los brazos de homología son homólogos a la secuencia genómica CD4 no humana (por ejemplo, de ratón). En la Figura 1, diagrama inferior, se representa una construcción ilustrativa de la invención.

Un casete de selección es una secuencia de nucleótidos insertada en una construcción directora para facilitar la selección de células (por ejemplo, células ES) que han integrado la construcción de interés. Un número de casetes de selección adecuados son conocidos en la técnica. De manera habitual, un casete de selección permite la selección positiva en presencia de un antibiótico concreto (por ejemplo, Neo, Hyg, Pur, CM, SPEC, etc.). Además, un casete de selección puede estar flanqueado por sitios de recombinación, que permiten la delección del casete de selección tras el tratamiento con enzimas recombinasa. Los sitios de recombinación comúnmente usados son *loxP* y *Frt*, reconocidos por las enzimas Cre y Flp, respectivamente, pero se conocen otros en la técnica. Un casete de selección puede estar ubicado en cualquier lugar de la construcción fuera de la región de codificación. En una realización, el casete de selección está ubicado entre el exón 3 y el exón 4 de la secuencia de CD4 humana.

Tras completar el direccionamiento del gen, las células ES o el animal no humano modificado 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 no se limitan a) transferencia Southern, PCR larga, PCR cuantitativa (por ejemplo, PCR en tiempo real usando TAQMAN®), hibridación *in situ* de fluorescencia, transferencia Northern, citometría de flujo, análisis Western, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, etc. En un ejemplo, los animales no humanos (por ejemplo, ratones) que tienen la modificación genética de interés se pueden identificar al detectar la pérdida del alelo del ratón y/o la ganancia del alelo humano utilizando una modificación del ensayo del alelo 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.

En un ejemplo, se divulga un método para fabricar una molécula CD4 quimérica humana/no humana, que comprende expresar en una única célula una proteína CD4 quimérica a partir de una construcción nucleotídica como se describe en el presente documento. En un ejemplo, la construcción nucleotídica es un vector viral; en un ejemplo específico, el vector viral es un vector lentiviral. En un ejemplo, la célula se selecciona entre CHO, COS, 293, HeLa y una célula retiniana que expresa una secuencia de ácido nucleico viral (por ejemplo, una célula PERC.6™).

En un aspecto, se proporciona una célula de roedor modificada genéticamente que expresa una proteína CD4 quimérica. En una realización, la célula comprende un vector de expresión que comprende una secuencia CD4 quimérica como se describe en el presente documento. En un ejemplo, la célula se selecciona entre CHO, COS, 293, HeLa y una célula retiniana que expresa una secuencia de ácido nucleico viral (por ejemplo, una célula PERC.6™).

También se divulga una molécula CD4 quimérica fabricada por un animal no humano como se describe en el presente documento, en donde, en un ejemplo, la molécula CD4 quimérica comprende una secuencia de aminoácidos de todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de una proteína CD4 humana, y al menos dominios transmembrana y citoplasmáticos de una proteína CD4 no humana, por ejemplo, proteína CD4 de ratón. En otra realización, se divulga una molécula CD4 quimérica fabricada por un animal no humano como se describe en el presente documento, en donde la molécula CD4 quimérica comprende una secuencia de aminoácidos de al menos todos o sustancialmente todos los dominios D1 de un CD4 humano, por ejemplo, al menos todos o sustancialmente todos los dominios D1-D2 de un CD4 humano, por ejemplo, al menos todos o sustancialmente todos los dominios D1-D3 de un CD4 humano, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de CD4 humano que es responsable de la unión a CMH II y/o al dominio extracelular de un TCR, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de CD4 humano que es responsable de la unión a CMH II y/o a un dominio variable de un TCR; y en donde el resto de la proteína (por ejemplo, el dominio transmembrana, el dominio citoplasmático, cualquier porción del dominio extracelular que no haya sido humanizada) se obtiene a partir de la secuencia de proteína endógena no humana.

Diversas realizaciones y ejemplos descritos en el presente documento anteriormente en relación con animales que expresan la proteína CD4 quimérica, así como las células y tejidos que la comprenden, puede ser aplicable a las realizaciones que describen animales no humanos que expresan CD8 humano/no humano quimérico, descritos a continuación en el presente documento, o animales que expresan otros co-receptores de células T no humanas de roedor/humano quiméricos importantes.

Animales CD8 modificados genéticamente

En el presente documento se divulgan animales no humanos modificados genéticamente que comprenden en su genoma, por ejemplo, en un locus CD8 endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 humanizado; de esta manera, los animales expresan un polipéptido CD8 humanizado. En diversos ejemplos, la divulgación proporciona animales no humanos que comprenden en su genoma, por ejemplo, en un locus CD8 endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8α humanizado y una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8β humanizado. Por lo tanto, el animal no humano modificado genéticamente de la divulgación expresa un CD8α humanizado y/o un polipéptido o polipéptidos CD8β humanizados.

La proteína CD8 humana se expresa normalmente en la superficie celular como heterodímero de dos polipéptidos, CD8α y CD8β, aunque también se han detectado homodímeros y homomúltimeros unidos por enlaces disulfuro (por ejemplo, en células NK y células T y δ intestinales, que expresan CD8αα). Los genes que codifican CD8α y CD8β humanos están ubicados 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 la inmunoglobulina V, una región bisagra, un dominio transmembrana y una cola citoplásmica. 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 CD8α se representan esquemáticamente en las Figuras 4 y 5.

El gen CD8β humano se encuentra aguas arriba del gen CD8α en el cromosoma 2. Se han informado múltiples isoformas generadas por el empalme alternativo del gen CD8β, con una isoforma predicha que carece de un dominio transmembrana y genera 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 CD8β se representan esquemáticamente en las Figuras 3 y 5.

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

La proteína CD8 se expresa comúnmente en las células T citotóxicas e interactúa con las moléculas MHC I. La interacción está mediada a través de la unión de CD8 al dominio α_3 del MHC I. Aunque la unión del MHC de clase I al CD8 es de aproximadamente 100 veces más débil que la unión del TCR al MHC de clase I, la unión de CD8 mejora la afinidad de la unión de 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 de MHC de clase I es específico de especie; el homólogo de ratón de CD8, Lyt-2, se mostró que une moléculas H-2D^d en el dominio α_3 , pero no unió moléculas HLA-A. Connolly et al. (1988) The Lyt-2 Molecule Recognizes Residues in the Class I α_3 Domain in Allogeneic Cytotoxic T Cell Responses, *J. Exp. Med.* 168:325-341. La unión diferencial se debió presumiblemente a determinantes similares a CDR (tipo CDR1 y CDR2) sobre CD8 que no se había 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 informado que el CD8 une HLA-A2 en una región conservada en el dominio α_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 concomitante en la lisis mediada por linfocitos T. Salter et al. (1989), Polymorphism in the α_3 domain of HLA-A molecules affects binding to CD8, *Nature* 338:345-348. En general, el polimorfismo en el dominio α_3 de las moléculas HLA-A también afectó la unión a CD8. *Id.* En ratones, la sustitución de aminoácidos en el resto 227 en H-2D^d afectó a la unión de Lyt-2 de ratón a H-2D^d y las células transfectadas con un mutante H-2D^d no fueron lisadas por células T CD8+. 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 las células T al antígeno presentado por el MHC I humano o humanizado.

Al igual que en CD4, el dominio citoplásmico de CD8 interactúa con la tirosina quinasa Lck, que a su vez da lugar a la activación de las células T. Aunque Lck parece interactuar con el dominio citoplásmico de CD8 α , parece que esta interacción está regulada por la presencia del dominio citoplásmico de CD8 β porque las mutaciones o la eliminación del dominio citoplásmico de CD8 β dieron como resultado una actividad de Lck asociada a CD8 α reducida. Irie et al. (1998) The cytoplasmic domain of CD8 β Regulates Lck Kinase Activation and CD8 T cell Development, *J. Immunol.* 161:183-91. La reducción en la actividad de Lck se asoció al deterioro en el desarrollo de células T. *Id.*

La expresión de CD8 en células apropiadas, por ejemplo, células T citotóxicas, está estrechamente regulada por diversos elementos potenciadores ubicados en todo el locus CD8. Por ejemplo, al menos 4 regiones de hipersensibilidad a ADNasa I, regiones a menudo asociadas con la unión del regulador, se han identificado en el locus 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 ADNasa I en el locus CD8, se han identificado al menos 5 elementos potenciadores, diseminada por el locus CD8, que regulan la expresión de CD8 α y/o β en células T de diversos linajes, incluyendo DP, células T CD8 SP 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 Online Erratum; 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 de CD4 endógeno y los elementos reguladores para animales modificados genéticamente de CD4 humanos o humanizados, en algunos ejemplos, puede haber un beneficio en el desarrollo de un animal no humano modificado genéticamente que retenga el promotor endógeno del ratón y elementos reguladores que controlarían la expresión de CD8 humano o humanizado. Puede haber un beneficio particular en la creación de animales modificados genéticamente que comprenden un reemplazo de secuencias no humanas endógenas que codifican proteínas CD8 α y/o β con aquellas que codifican proteínas CD8 α y/o β humanas o humanizadas, como se describe en el presente documento.

En el presente documento se divulga un animal no humano modificado genéticamente que comprende en su genoma, por ejemplo, en su locus CD8 endógeno, al menos una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 α humano/no humano (por ejemplo, un polipéptido CD8 α y/o β) en donde una porción humana del polipéptido comprende todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de un CD8 humano (por ejemplo, CD8 α y/o β) en donde una porción no humana comprende al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un CD8 no humano (por ejemplo, CD8 α y/o β) y en donde el animal expresa el polipéptido CD8 quimérico (por ejemplo, el polipéptido CD8 α y/o β). Por lo tanto, en un ejemplo, un animal no humano modificado genéticamente que comprende en su locus CD8 roedor endógeno una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 α humano/no humano quimérico y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 β humano/no humano quimérico, en donde la primera secuencia de nucleótidos comprende una secuencia que codifica todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de un polipéptido CD8 α humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD8 α no humano, y en donde la segunda secuencia de nucleótidos comprende una secuencia que codifica todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de un polipéptido CD8 β humano y al menos dominios

transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD β no humano, en donde el animal expresa una proteína CD8 humana/no humana quimérica funcional. En un ejemplo, el animal no humano solo expresa un polipéptido CD8 humanizado (por ejemplo, el polipéptido CD8 α y/o β humano/no humano quimérico), y no expresa un polipéptido o polipéptidos CD8 funcional(es) no humano(s) correspondiente(s) del locus endógeno CD8.

En un ejemplo, el polipéptido CD8 α humano/no humano quimérico comprende en su porción humana todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de un polipéptido CD8 α humano. En un ejemplo, la porción humana del polipéptido CD8 α quimérico comprende al menos el dominio de unión a MHC I del polipéptido CD8 α humano. En un ejemplo, la porción humana del polipéptido CD8 α quimérico comprende la secuencia de al menos todo o sustancialmente todo el dominio tipo inmunoglobulina V del CD8 α humano. En un ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica la porción humana del polipéptido CD8 α quimérico comprende al menos los exones que codifican un dominio extracelular del polipéptido CD8 α humano. En un ejemplo, la secuencia de nucleótidos comprende al menos los exones que codifican los dominios similares a Ig V. En un ejemplo, el dominio extracelular de un polipéptido CD8 α humano es una región que abarca el dominio del polipéptido que no es un dominio transmembrana o citoplásmico. En un ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido CD8 α humano/no humano quimérico comprende la secuencia que codifica un péptido señal de CD8 α no humano (por ejemplo, roedor, por ejemplo, ratón). Como alternativa, la secuencia de nucleótidos puede comprender la secuencia que codifica una secuencia de señal CD8 α humana. En un ejemplo, el polipéptido CD8 α humano/no humano quimérico comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 54, y la porción humana del polipéptido quimérico se expone en los aminoácidos 28-179 de la SEQ ID NO: 54 (representados por separado en la SEQ ID NO: 59).

De manera similar, en un ejemplo, el polipéptido CD8 β humano/no humano quimérico comprende en su porción humana todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de un polipéptido CD8 β humano. En un ejemplo, la porción humana del polipéptido CD8 β quimérico comprende la secuencia de todo o sustancialmente todo el dominio tipo inmunoglobulina V de CD8 β . En un ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica la porción humana del polipéptido CD8 β quimérico comprende al menos los exones que codifican el dominio extracelular del polipéptido CD8 β humano. En un ejemplo, la porción humana del polipéptido CD8 β humano/no humano quimérico comprende al menos los exones que codifican el dominio tipo IgG V de CD8 β . En un ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido CD8 β humano/no humano quimérico comprende la secuencia que codifica un péptido señal de CD8 β no humano (por ejemplo, roedor, por ejemplo, ratón). Como alternativa, la secuencia de nucleótidos puede comprender la secuencia que codifica una secuencia de señal CD8 β humana. En un ejemplo, el polipéptido CD8 β humano/no humano quimérico comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 53, y la porción humana del polipéptido quimérico se expone en los aminoácidos 15-165 de la SEQ ID NO: 53 (representados por separado en la SEQ ID NO: 58).

En un ejemplo, el animal no humano expresa polipéptidos CD8 α y/o CD8 β humano/no humano quiméricos. En algunos ejemplos, la porción humana del polipéptido CD8 α y/o β humano/no humano quimérico comprende una o más modificación o modificaciones conservativas o no conservativas.

En un aspecto, se proporciona un animal no humano que expresa una secuencia de polipéptido CD8 α y/o β humano, en donde la secuencia del polipéptido CD8 α y/o β humano es al menos aproximadamente el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a una secuencia de polipéptido CD8 α y/o β humana, respectivamente. En un ejemplo específico, la secuencia del polipéptido CD8 α y/o β humano es al menos aproximadamente el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a la respectiva secuencia de polipéptido CD8 α y/o β humana descrita en los Ejemplos. En un ejemplo, la secuencia del polipéptido CD8 α y/o β humano comprende una o más sustituciones conservativas. En un ejemplo, la secuencia del polipéptido CD8 α y/o β humano comprende una o más sustituciones no conservativas.

En algunos ejemplos, 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 toda la secuencia generalmente incluye el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % de los aminoácidos que se cree 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 la alineación y los métodos de predicción de dominio usados.

En un ejemplo, la porción no humana del polipéptido CD8 α y/o β humano/no humano quimérico comprende al menos el dominio transmembrana y/o citoplásmico del polipéptido CD8 α y/o β no humano, respectivamente. Debido a las funciones importantes servidas por el dominio citoplásmico CD8, la retención de la secuencia no humana endógena (por ejemplo, ratón) en animales genéticamente diseñados asegura la preservación de la señalización intracelular adecuada y otras funciones del co-receptor. En un ejemplo, el animal no humano es un ratón, y el polipéptido CD8 α y/o β no humano es un polipéptido CD8 α y/o β del ratón, respectivamente. Aunque las secuencias específicas de CD8 α y β de ratón se describen en los Ejemplos, cualquier secuencia adecuada derivada de la misma, por ejemplo, secuencia que comprende sustituciones de aminoácidos conservativas/no conservativas, se abarca en el presente documento. En un ejemplo, el animal no humano (por ejemplo, roedor, por ejemplo, ratón), retiene cualquier secuencia endógena que no haya sido humanizada.

El animal no humano descrito en el presente documento puede comprender en su locus endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 α y/o β humano/roedor quimérico. En un ejemplo, esto resulta en un reemplazo de una porción de un gen CD8 α endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica una porción de un polipéptido CD8 α humano, y/o un reemplazo de una porción de un gen CD8 β endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica una porción de un polipéptido CD8 β humano. En un ejemplo, dicha sustitución es un reemplazo de la secuencia de nucleótidos endógena que codifica todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de un CD8 α y/o β no humano con un nucleótido humano con una secuencia de nucleótidos humana que codifica la misma. En un ejemplo, dicha sustitución es una sustitución de una secuencia que codifica al menos todo de sustancialmente todo el dominio similar a inmunoglobulina V de un CD8 α y/o β no humano con una secuencia de nucleótidos humanos que codifica la misma. En un ejemplo, el reemplazo no comprende un reemplazo de una secuencia CD8 α y/o β que codifica el dominio transmembrana y citoplásmico de un polipéptido CD8 α y/o β no humano. Por lo tanto, el animal no humano expresa un polipéptido CD8 α y/o β humano/no humano quimérico del locus CD8 no humano endógeno. En otro un ejemplo más, el reemplazo resulta en una proteína CD8 α y/o β que comprende una secuencia polipeptídica expuesta en la SEQ ID NO: 54 y/o 53, respectivamente.

En un ejemplo, se proporciona la secuencia de nucleótidos del locus CD8 quimérico humano/no humano (por ejemplo, el locus CD8 de roedor quimérico, por ejemplo, el locus CD8 de ratón quimérico). En un ejemplo debido a que la secuencia CD8 α y/o β de humano/no humano (por ejemplo, humano/roedor, por ejemplo, humano/ratón) quimérica se coloca en el locus CD8 α y/o β no humano (por ejemplo, roedor, por ejemplo, ratón) endógeno respectivo, retiene el promotor CD8 α y/o β endógeno y los elementos reguladores. En otro ejemplo, el locus quimérico puede contener el promotor de CD8 α y/o β humano y elementos reguladores en la medida en que permitan la correcta expresión de CD8 α y/o β (expresión adecuada de proteínas espaciales y temporales), desarrollo de células T CD8+, la elección de linaje CD8 y la función de co-receptor. Por lo tanto, en un ejemplo, los animales de la invención comprenden una modificación genética que no altera la elección adecuada del linaje y el desarrollo de células T. En un ejemplo, los animales (por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratones) de la invención no expresan la proteína CD8 quimérica en células inmunes distintas de las células que normalmente expresan CD8, por ejemplo, los animales no expresan CD8 en células B o células T CD4+ SP. En un ejemplo, el reemplazo da como resultado la retención de elementos que permiten una regulación espacial y temporal adecuada de la expresión de CD8 α y/o β .

Un animal no humano modificado genéticamente que comprende polipéptidos CD8 humanos o humanizados descritos en el presente documento puede seleccionarse de cualquier animal que se describió anteriormente en la sección relativa a animales CD4 humanizados. En un ejemplo, el animal no humano puede ser un roedor, por ejemplo, una rata o un ratón.

Por lo tanto, en un ejemplo, la invención proporciona un ratón modificado genéticamente que comprende en su genoma, en su locus CD8 endógeno, una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 α humano/ratón quimérico y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 β humano/ratón quimérico. En un ejemplo, la primera secuencia de nucleótidos comprende una secuencia que codifica todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de un polipéptido CD8 α humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido de CD8 α de ratón, y la segunda secuencia de nucleótidos comprende una secuencia que codifica todos o sustancialmente todos un dominio extracelular, un polipéptido CD8 β humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD8 β de ratón, y en donde el ratón expresa una proteína CD8 humana/ratón quimérica funcional. En un ejemplo, la primera secuencia de nucleótidos comprende una secuencia que codifica al menos el dominio tipo inmunoglobulina V del polipéptido CD8 α humano y las secuencias restantes de un polipéptido CD8 α de ratón, y la segunda secuencia de nucleótidos comprende una secuencia que codifica al menos el dominio de inmunoglobulina tipo V del polipéptido CD8 β humano y las secuencias restantes de un polipéptido CD8 β de ratón. La primera secuencia de nucleótidos comprende al menos el dominio de unión a MHC I de un polipéptido CD8 α humano. En un ejemplo, la primera y la segunda secuencia de nucleótidos comprenden al menos los exones que codifican el dominio extracelular de un polipéptido CD8 α humano y/o polipéptido CD8 β , respectivamente. En un ejemplo, el dominio extracelular de un polipéptido CD8 α humano y/o polipéptido CD8 β es una región que abarca el dominio del polipéptido CD8 α humano y/o polipéptido CD8 β que no es un dominio transmembrana o citoplásmico. En un ejemplo, los dominios de un polipéptido CD8 α humano son como se representan esquemáticamente en las Figuras 4 y 5. En un ejemplo, los dominios de un polipéptido CD8 β humano son como se representan esquemáticamente en las Figuras 3 y 5. En un ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido CD8 α humano/ratón quimérico y/o el polipéptido CD8 β comprende la secuencia que codifica un péptido señal CD8 α y/o CD8 β de ratón, respectivamente. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos puede comprender la secuencia que codifica una secuencia señal CD8 α y/o CD8 β humana. En un ejemplo, el ratón comprende un reemplazo de una secuencia de nucleótidos que codifica todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de CD8 α y/o CD8 β de ratón con una secuencia de nucleótidos que codifica todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de CD8 α y/o CD8 β humano, respectivamente.

En un ejemplo, El ratón no expresa un polipéptido CD8 α y/o CD8 β endógeno funcional desde su locus CD8 endógeno. En un ejemplo, el ratón, tal como se describe en la presente memoria, comprende la secuencia de CD8 quimérica/humana en su línea germinal.

En un ejemplo, el ratón que expresa el polipéptido CD8 α y/o CD8 β humano/ratón quimérico retiene el promotor CD8 α y/o CD8 β de ratón y las secuencias reguladoras, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos en el ratón que codifica el CD8 humano/ratón quimérico está unida operativamente al promotor CD8 de ratón endógeno y a las secuencias reguladoras. En un ejemplo, estas secuencias reguladoras retenidas en el ratón incluyen las secuencias que regulan la expresión de la proteína CD8 en las etapas apropiadas del desarrollo de las células T. En un ejemplo, el ratón modificado genéticamente no expresa CD8 quimérico en células B o células T de linaje CD4, o cualquier célula, por ejemplo, célula inmunitaria, que normalmente no expresa CD8 endógeno.

En diversos ejemplos, un animal no humano (por ejemplo, , un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata) que expresa una proteína CD8 quimérica funcional (por ejemplo, CD8 $\alpha\beta$ o CD8 $\alpha\alpha$) de un locus CD8 quimérico como se describe en el presente documento muestra la proteína quimérica en una superficie celular. En un ejemplo, el animal no humano expresa la proteína CD8 quimérica sobre una superficie celular en una distribución celular que es la misma que se observa en un humano. En un ejemplo, La proteína CD8 de la invención es capaz de interactuar con una proteína MHC I expresada en la superficie de una segunda célula.

En un ejemplo, el animal no humano, (por ejemplo, roedor, por ejemplo, ratón) de la invención comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína MHC I humana o humanizada, de manera que la proteína CD8 quimérica expresada en la superficie de una célula T del animal es capaz de interactuar con un MHC I humano o humanizado expresado en una superficie de una segunda célula, por ejemplo, una célula presentadora de antígeno. En un ejemplo, la proteína MHC I comprende un dominio extracelular de un polipéptido MHC I humano. En un ejemplo, el animal comprende además un polipéptido de β -2 microglobulina humano o humanizado. Se describen animales modificados genéticamente a modo de ejemplo que expresan un polipéptido MHC I humano o humanizado y/o un polipéptido de β -2 microglobulina en la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 13/661.159, presentada el 26 de octubre de 2012 y en la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 13/793.812, presentada el 11 de marzo de 2013. Por lo tanto, en un ejemplo, 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 MHC I humanizado, por ejemplo, en donde el polipéptido MHC I humanizado comprende un dominio extracelular de MHC I humano y dominios transmembrana y citoplásmicos de un MHC I endógeno (por ejemplo, ratón), por ejemplo, en donde el MHC I humanizado comprende los dominios α 1, α 2 y α 3 de un polipéptido MHC I humano y (2) un polipéptido de microglobulina β 2 humana o humanizada (por ejemplo, el animal comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos establecida en los exones 2, 3 y 4 de una microglobulina β 2 humana). En un ejemplo, tanto el MHC I humanizado como los polipéptidos de la microglobulina β 2 humana o humanizada están codificados por secuencias de nucleótidos ubicadas en loci de microglobulina MHC I y β 2 endógenos, respectivamente; en un ejemplo, el animal no expresa polipéptidos de microglobulina MHC I y β 2 endógenos funcionales. Por lo tanto, el MHC I expresado por los animales puede ser un polipéptido MHC I humano/no humano, por ejemplo, humano/roedor (por ejemplo, humano/ratón). Una porción humana del polipéptido MHC I quimérico puede derivar de una proteína HLA 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 HLA clase I presente en una población humana. En el ejemplo, en donde el animal es un ratón, una porción no humana (es decir, un ratón) del polipéptido MHC I quimérico puede derivar de una proteína MHC I de ratón seleccionada de H-2D, H-2K y H-2L. En un ejemplo, el animal no humano que comprende el CD8 humano/no humano quimérico descrito en el presente documento y la microglobulina MHC I y/o β -2 humanizada descrita en la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 13/661.159 y 13/793.812 pueden generarse criando un animal que comprende un locus CD8 quimérico (por ejemplo, locus CD8 α y/o β quimérico) como se describe en el presente documento con un animal que comprende un locus de MHC I y/o β -2 microglobulina humanizado. El animal también se puede generar mediante la introducción en células ES de un animal que comprende el locus MHC I humanizado y/o β -2 microglobulina una secuencia de nucleótidos que codifica CD8 quimérico (por ejemplo, CD8 α y/o β quimérico), por ejemplo, para el reemplazo en el locus CD8 endógeno (por ejemplo, locus CD8 α y/o β quimérico); o la introducción en células ES de un animal que comprende un locus CD8 quimérico (por ejemplo, locus CD8 α y/o β quimérico) una secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican MHC I humanizado y/o microglobulina β -2.

Además de un animal no humano modificado genéticamente, también se divulga un embrión no humano (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o un embrión de rata), en donde el embrión comprende una célula ES donante obtenida a partir de un animal no humano (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata) como se describe en el presente documento. En un ejemplo, el embrión comprende una célula ES donante que comprende el gen CD8 quimérico, y células embrionarias huésped.

También se divulga un tejido, en donde el tejido se obtiene a partir de un animal no humano (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata) como se describe en el presente documento, y expresa la proteína CD8 quimérica.

Además, se divulga una célula no humana aislada de un animal no humano como se describe en el presente documento. En un ejemplo, la célula es una célula ES. En un ejemplo, la célula es una célula T, por ejemplo, una célula T CD8 $^{+}$. En un ejemplo, la célula es una célula T citotóxica.

También se divulga una célula no humana que comprende un cromosoma o fragmento del mismo de un animal no humano como se describe en el presente documento. En un ejemplo, la célula no humana comprende un núcleo de un animal no humano como se describe en el presente documento. En un ejemplo, la célula no humana comprende

el cromosoma o fragmento del mismo como resultado de una transferencia nuclear.

En un ejemplo, se divulga una célula pluripotente inducida no humana que comprende un gen que codifica un polipéptido CD8 quimérico (por ejemplo, polipéptido CD8 α y/o CD8 β) como se describe en el presente documento. En un ejemplo, la célula pluripotente inducida se obtiene a partir de un animal no humano como se describe en el presente documento.

En un ejemplo, se divulga un hibridoma o cuadroma obtenido a partir de una célula de un animal no humano como se describe en el presente documento. En un ejemplo, el animal no humano es un ratón o una rata.

En un ejemplo, se divulga una preparación *in vitro* que comprende una célula T que lleva una proteína CD8 quimérica en su superficie y una segunda célula que se une a la CD8 quimérica. En un ejemplo, la segunda célula es una célula que expresa un polipéptido MHC I, por ejemplo, una proteína MHC I quimérica humana/no humana. En un ejemplo, el CD8 quimérico en la superficie de la primera célula interactúa con el MHC I quimérico en la superficie de la segunda célula. En un ejemplo, la proteína CD8 quimérica conserva la interacción con moléculas citosólicas endógenas, por ejemplo, moléculas de señalización citosólicas endógenas (por ejemplo, Lck endógena, etc.).

También se divulga en el presente documento un método para fabricar un animal no humano diseñado genéticamente descrito en el presente documento. El método da como resultado un animal no humano que comprende en un locus CD8 endógeno una secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido CD8 α y/o CD8 β humano/no humano quimérico. El método puede utilizar una construcción directora preparada usando la tecnología VELOCIGENE®, introduciendo la construcción en las células ES, e introduciendo los clones de células ES dirigidas en un embrión de ratón utilizando la tecnología VELOCIMOUSE®, como se describe en los Ejemplos.

En el presente documento se divulga un método para modificar un locus CD8 de un animal no humano para expresar un polipéptido CD8 humano/no humano quimérico descrito en el presente documento. En un ejemplo, se divulga un método para modificar un locus CD8 de un ratón para expresar un polipéptido CD8 humano/ratón quimérico que comprende reemplazar en un locus CD8 endógeno de un ratón una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 de ratón endógeno con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD8 humano/ratón quimérico. El polipéptido CD8 se puede seleccionar de CD8 α , CD8 β y una combinación de los mismos. En un ejemplo, el polipéptido quimérico comprende todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de un polipéptido CD8 humano y al menos dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido CD8 de ratón endógeno.

Por lo tanto, también se describe una construcción de nucleótidos para generar animales modificados genéticamente descritos en el presente documento. En un ejemplo, la secuencia de la construcción de nucleótidos comprende brazos de homología 5' y 3', un fragmento de ADN que comprende la secuencia CD8 α o CD8 β humana, y un casete de selección flanqueado por sitios de recombinación. En algunos ejemplos, la secuencia humana comprende intrones y exones de CD8 α o CD8 β humanos, por ejemplo, exones que codifican el dominio extracelular del CD8 α o CD8 β humano, respectivamente. En un ejemplo, los brazos de homología son homólogos a la secuencia no humana CD8 α o CD8 β . Algunas construcciones a modo de ejemplo para CD8 α y CD8 β se representan en las Figuras 4 y 3, respectivamente.

Debido a la cercana localización cromosómica de los genes que codifican CD8 α y CD8 β , la selección secuencial de los dos genes mejora las posibilidades de una humanización exitosa. En un ejemplo, la estrategia de direccionamiento comprende la introducción de la construcción CD8 β quimérica descrita en el presente documento en las células ES, generar un ratón desde las células ES diana, derivar células ES modificadas genéticamente de dicho ratón, e introducir la construcción de CD8 α quimérica descrita en el presente documento en dichas células ES modificadas genéticamente. En otro ejemplo, la estrategia de direccionamiento comprende la introducción de una construcción CD8 β quimérica descrita en el presente documento en las células ES, seleccionar las células que han incorporado la construcción quimérica de CD8 β , introducir una construcción de CD8 α quimérica descrita en el presente documento en células ES que han incorporado y que albergan la construcción de CD8 β quimérica, y seleccionando las células que han incorporado tanto CD8 β como CD8 α quiméricas. Las etapas de selección se pueden realizar utilizando diferentes marcadores de selección. En ejemplos alternativos, la humanización de CD8 α se puede lograr primero. Tras completar el direccionamiento del gen, las células ES de animales no humanos modificados genéticamente pueden cribarse para confirmar la incorporación exitosa de la secuencia de nucleótidos exógena de interés o la expresión de un polipéptido exógeno mediante varios métodos (por ejemplo, los métodos descritos anteriormente para la humanización de CD4, por ejemplo, la modificación del ensayo de alelos descrito en Valenzuela et al., *supra*).

En un ejemplo, se divulga un método para hacer una molécula de CD8 humana/no humana quimérica (por ejemplo, CD8 α y/o CD8 β), que comprende expresar en una sola célula un polipéptido o polipéptidos de CD8 quiméricos de una construcción o construcciones de nucleótidos como se describe en el presente documento. En un ejemplo, la construcción de nucleótidos es un vector vírico; en una realización específica, el vector vírico es un vector lentivírico. En un ejemplo, la célula se selecciona de una célula CHO, COS, 293, HeLa y una célula retiniana que expresa una secuencia de ácido nucleico vírico (por ejemplo, una célula PERC.6™).

En un ejemplo, se divulga una célula que expresa una proteína CD8 quimérica. En un ejemplo, la célula comprende

un vector de expresión que comprende una(s) secuencia(s) CD8 quimérica(s) como se describe(n) en el presente documento. En un ejemplo, la célula se selecciona de CHO, COS, 293, HeLa y una célula retiniana que expresa una secuencia de ácido nucleico viral (por ejemplo, una célula PERC.6™).

También se divulga una molécula CD8 quimérica fabricada por un animal no humano como se describe en el presente documento, en donde la molécula CD8 quimérica comprende todo o sustancialmente todo el dominio extracelular de una proteína CD8 humana (por ejemplo, CD8 α y/o CD8 β), y al menos dominios transmembrana y citoplasmáticos de una proteína CD8 no humana, por ejemplo, proteína CD8 de ratón. El polipéptido CD8 α quimérico ilustrativo se expone en la SEQ ID NO:54, y la proteína CD8 β quimérica ejemplar se expone en la SEQ ID NO:53.

Uso de animales CD4 y CD8 modificados genéticamente

Los animales no humanos modificados genéticamente, por ejemplo, ratones o ratas, que comprenden CD4 y MHC II humanizados o CD8 y MHC I humanizados, presentar los péptidos a las células T (células CD4+ o CD8+ T, respectivamente) de manera humana, ya que, sustancialmente, todos los componentes del complejo son humanos o humanizados. Los animales no humanos modificados genéticamente de la invención se pueden usar para estudiar la función de un sistema inmune humano en el animal humanizado; para la identificación de antígenos y epítomos de antígenos que provocan una respuesta inmune (por ejemplo, epítomos de células T, por ejemplo, epítomos únicos de cáncer humano), por ejemplo, para su uso en el desarrollo de vacunas; para la identificación de células T de alta afinidad con patógenos humanos o antígenos del cáncer (es decir, células T que se unen al antígeno en el contexto del complejo MHC I humano con alta avidéz), por ejemplo, para su uso en terapia adaptativa de células T; para evaluar candidatos de vacunas y otras estrategias de vacunas; para estudiar la autoinmunidad humana; para estudiar las enfermedades infecciosas humanas; y de otro modo para idear mejores estrategias terapéuticas basadas en MHC humano y expresión de CD4/CD8.

Por lo tanto, en diversos ejemplos, los animales modificados genéticamente de la presente invención son útiles, entre otras cosas, para evaluar la capacidad de un antígeno para iniciar una respuesta inmune en un ser humano, y para generar diversos antígenos e identificar un antígeno específico que se pueda usar en el desarrollo de vacunas humanas.

En un ejemplo, se divulga un método para determinar si un péptido provocará una respuesta inmune 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 monte una respuesta inmune, y detectar en el animal no humano una célula (por ejemplo, una célula T CD8+ o CD4+, que comprende un CD8 o CD4 humano, respectivamente) que se une a una secuencia del péptido presentado por una molécula de MHC I o II quimérico humano/no humano como se describe en este documento. En un ejemplo, el animal no humano después de la exposición comprende un linfocito T citotóxico (CTL) CD8+ restringido por MHC de clase I que se une al péptido. En otra realización, el roedor que sigue a la exposición comprende una célula T CD4+ restringida por MHC II que se une al péptido.

En un ejemplo, se divulga un método para identificar un epítipo de células T humanas, que comprende exponer un animal no humano como se describe en el presente documento a un antígeno que comprende un epítipo de células T putativo, permitiendo que el animal no humano monte una respuesta inmune, aislando del animal no humano una célula T restringida por MHC de clase I o clase II de MHC que se une al epítipo, e identificando el epítipo unido por dicha célula T.

En un ejemplo, se divulga un método para identificar un antígeno que genera una respuesta de células T en un ser humano, que comprende exponer un antígeno putativo a un ratón como se describe en el presente documento, permitiendo que el ratón genere una respuesta inmune, e identificando el antígeno unido por la molécula restringida HLA clase I o clase II.

En un ejemplo, se divulga un método para determinar si un antígeno putativo contiene un epítipo que, al exponerse a un sistema inmunitario humano, generará una respuesta inmune restringida por HLA de clase I o clase II, que comprende exponer un ratón como se describe en el presente documento al antígeno putativo y medir una respuesta inmune restringida a HLA clase I o HLA clase II específica de antígeno en el ratón.

Además, los animales no humanos diseñados genéticamente descritos en el presente documento pueden ser útiles para la identificación de receptores de células T, por ejemplo, receptores de células T de alta avidéz, que reconozcan un antígeno de interés, por ejemplo, un antígeno de tumor u otro de la enfermedad. El método puede comprender: exponer el animal no humano descrito en el presente documento a un antígeno, permitiendo que el animal no humano monte una respuesta inmune al antígeno, aislando del animal no humano una célula T que comprende un receptor de células T que se une al antígeno presentado por un MHC I o MHC II humano o humanizado, y determinando la secuencia de dicho receptor de células T.

En un ejemplo, se divulga un método para determinar la activación de células T por un agente terapéutico humano putativo, 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 humana o humanizada que expresa MHC II o MHC I de tal 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 una célula T que comprende un CD4 o CD8 humano/no humano (por ejemplo, humano/ratón) capaz de unirse a la célula del animal modificado genéticamente, y medir la activación de la célula T que es inducida por la célula que exhibe 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 divulgación pueden usarse para identificar autoantígenos de importancia para enfermedades autoinmunes humanas, por ejemplo, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, etc. Asimismo, los animales modificados genéticamente de la invención pueden usarse para estudiar diversos aspectos de la enfermedad autoinmune humana, y pueden usarse como modelos de enfermedad autoinmune.

Otros usos de los animales modificados genéticamente descritos en el presente documento, es decir, animales que comprenden un co-receptor de células T humano o humanizado (por ejemplo, CD4 o CD8 humano/no humano quimérico), que opcionalmente comprenden además una proteína MHC II o I humana o humanizada, será evidente a partir de la presente divulgación.

Ejemplos

La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes. Estos Ejemplos se exponen para ayudar en la comprensión de la invención, pero no pretenden, y no deben interpretarse como, limitando su alcance de ninguna manera. Los ejemplos no incluyen descripciones detalladas de métodos convencionales que serían bien conocidos para 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 el peso molecular promedio, la temperatura se indica en grados Celsius y la presión es la atmosférica o casi atmosférica.

Ejemplo 1. Construcción y caracterización de ratones CD4 modificados genéticamente

Ejemplo 1.1: Diseño por ingeniería de un locus CD4 quimérico

El locus CD4 de ratón se humanizó en una única etapa mediante la construcción de un único vector director a partir de ADN (BAC) de cromosoma artificial bacteriano de humano y ratón usando la tecnología de VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la Patente de 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). Para generar el vector de direccionamiento, se llevaron a cabo una serie de recombinaciones homólogas bacterianas (BHR) que usan el ADN del Cromosoma Artificial Bacteriano (BAC), así como otras etapas de ingeniería.

En resumen, cuatro fragmentos de ADN (1) fragmento que contiene un péptido señal de ratón (codificado por los exones 2 y 3 del gen CD4 de ratón), (2) fragmento que contiene el exón 3 humano aguas abajo del péptido señal del ratón, (3) fragmento que contiene el casete de resistencia SPEC flanqueado por los sitios Asc I y Pst I y (4) fragmento que contiene 160 pb del intrón 6 de CD4 de ratón (intrón entre los exones 6 y 7), que comenzó aproximadamente 200 pb en dirección 3' del exón 6 de CD4 de ratón se unieron por ligación de fusión (Clonotech). El fragmento de ADN resultante contenía, de 5' a 3': exón 2 de ratón, intrón 2 de ratón, porción del exón 3 de ratón que contiene el péptido señal, exón humano 3 en dirección 3' del péptido señal humano, porción del intrón 3 humano, casete SPEC, porción del intrón 6 de ratón. Este fragmento de ADN se usó en BHR para modificar el clon BMQ391F08 de BAC de ratón para eliminar la secuencia de ratón que codifica los dominios 1-3 similares a Ig de CD4 de ratón y para introducir el exón 3 de CD4 humano. El casete CM del BAC se sustituyó por el casete SPEC dando como resultado el primer vector BAC (Figura 1, diagrama superior).

El BAC RP11-101F21 humano fue modificado por BHR para introducir el casete AscI-LoxP-PGK-neo-loxP 60 pb en dirección 3' del exón 3 humano, y para introducir el sitio de restricción Pst I y el casete SPEC aproximadamente 100 pb corriente abajo del exón 6, dando como resultado el segundo vector BAC (Figura 1, diagrama medio). Esta etapa se siguió por la ligación de BAC a BAC del primer y segundo vectores de BAC después de la digestión con las enzimas de restricción AscI y Pst I para generar el vector de direccionamiento de CD4 (Figura 1, diagrama inferior). Las uniones en dirección 5' y en dirección 3' de las secuencias ratón-humano y humano-ratón, respectivamente, se enumeran en la Tabla 1 a continuación y se establecen en el Listado de Secuencias. La secuencia a través del intrón humano 3 - unión de casete lox-neo (extremo 5' del casete) se establece en la SEQ ID NO: 55 y la secuencia a través de la unión del casete lox-neo - intrón humano 3 (extremo 3' del casete) se expone en la SEQ ID NO: 56; ambas secuencias también se enumeran en la Tabla 1. La secuencia completa de ácido nucleico de la pieza de CD4 humanizada, incluyendo el casete pgk-neo representado en la Figura 1 se establece en la SEQ ID NO: 3. El casete pgk-neo abarca los restos 307-2176 de la SEQ ID NO: 3, los dos sitios lox están ubicados 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 de la proteína CD4 humanizada completa se presenta en la SEQ ID NO: 4, abarcando la secuencia humana los aminoácidos 27-319 (establecidos en la SEQ ID NO: 57).

Tabla 1. Secuencias de unión del vector de direccionamiento de CD4 quimérico

Unión	Secuencia	SEQ ID NO
unión 5' ratón/humano	AGGGGAAACCCGCAAAGGATGGGACATAGGGAGACAGCTGTTAACAT CTGAAACATGACCTTCITTTCTGTGCAGCACAACTCCTAGCTGTCAC TCAAGGG (AAGAAAGTGGTGCTGGGCAAAAAAGGGGATACAGTGGAA CTGACCTGTACAGCTTCCCAGAAGAAGAGCATACAATTCCACTGGAA AAACTCCAACCAGAT)	1
unión 3' humano/ratón	(CTGGTCACCTGGATGAAGTGAGGGAGGGCCCTCTGGGTTTGGGGCT GGTTTTGAAC TGAGACATCCATGAGCCAGCCTGGGGCTGGCTTCACT GAAGATC) ATCTATGTCGGGTGCGGAGAAAGAGGTAATGAAATGGCA CATGCTATGTACAAACTCTATTGCTGAGCAGCACCCAGTCTGAGCT GGCTCTGAATTGAGGGTGAAATTCACACATTCTCCCCAACATCTAT AATCTGG	2
Sitio humano/5' lox	(TATGGAGTGAAAGCCTTTGGTGTCTGAGATCTGGTCTTAGTTAAAC TCTGGGATC) GGC GCGCCGAATTCCTGCAGCCGGGCTCGAGATAAC TTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATATGCATCCGGGTAGGGGA GGCGCTTTTCCC	55
sitio 3' lox/humano	AGTATTGTTTTGCCAAGTTCTAATTCCATCAGACCTCGACCTGCAGC CCTAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATCCTAGG (C CAGAGGGCTTGGGTGACAGAAACTCAGTGGCATCTTATCCAGAGT TTCTCTACACC)	56

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 de selección de casete están en cursiva.

El vector de direccionamiento de CD4 humano se linealizó con NotI y se sometió a electroporación en células ES de ratón F1H4. Se identificaron células ES dirigidas que llevan un locus CD4 humanizado mediante genotipado utilizando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela et al.) que detectó la presencia del casete de neomicina y el gen CD4 humano, así como una copia del gen CD4 de ratón. Los cebadores y las sondas usados en el ensayo se muestran en la Tabla 2 a continuación y se exponen en el Listado de Secuencias.

Tabla 2. Cebadores y sondas para genotipado quimérico CD4

Región detectada	Ensayo	Cebador 5'	Cebador 3'	Sonda
Intrón 3 de CD4 de ratón (1765m2)	LOA	GAAGTGGGTGTGCC ATTCAGA (SEQ ID NO:5)	AAAGCTCAGAAGCA GACAGAGTCA (SEQ ID NO:6)	TTCCAAAAGCCTACA GCAGGCCUCAG (SEQ ID NO:7)
Intrón 5 de CD4 de ratón (1765m4)	LOA	TCATCTCCCTTCC TGAACCT (SEQ ID NO:8)	CCCAGCCACAAGAA GAAGAAA (SEQ ID NO:9)	CTTCCCCCGCATCCA TTTTCTGTTC (SEQ ID NO:10)
Intrón CD4 humano entre los exones 3 y 4 (en dirección 3' de pgk-neo) (1765h1)	GOA	GGTCTCGAACTCAT GAGCTCAA (SEQ ID NO:11)	GGCATAGTGACACA CACCTGTAAT (SEQ ID NO:12)	TGATCCACTCACCTT GGCTCTCAGAG (SEQ ID NO:13)
Intrón CD4 humano entre los exones 5 y 6 (1765h2)	GOA	GTCAGGGAGCTTAC TTTCTTTGTTG (SEQ ID NO:14)	TGTTAGTGTCCCTG AGTAAGTGGATT (SEQ ID NO:15)	CTCAGCTCCACACCC CTACCAAGTTGG (SEQ ID NO:16)

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

Se identificaron células ES dirigidas que tenían un locus CD4 humanizado sin marcador de resistencia mediante un genotipado que detectó la ausencia del casete de neomicina, la presencia de una copia del gen CD4 humano y una copia del gen CD4 de ratón.

Las células ES dirigidas anteriormente descritas 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 EE.UU. N.º 7.294.754 y Poueymirou et al. (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25(1):91-99). VELOCIMICE® (ratones F0 completamente derivados de la célula ES donadora) que portaban independientemente un gen CD4 quimérico se identificaron mediante genotipado usando un ensayo de modificación de alelo (Valenzuela *et al.*, *supra*) que detecta la presencia de las secuencias de gen CD4 humanas únicas.

Ejemplo 1.2: Expresión de CD4 quimérico en ratones genéticamente modificados

Los bazo de ratones TS o CD4 humanizados heterocigotos ("1766HET") se perfundieron con Colagenasa D (Roche Bioscience) y los eritrocitos se lisaron con tampón de lisis ACK. La expresión en la superficie celular de CD4 humano o CD4 de ratón se analizó mediante FACS usando anticuerpos CD4 antihumanos o CD4 anti-ratón, respectivamente.

5 Como se representa en las Figuras 2A y 2B, el CD4 humano se expresa en la superficie de las células T obtenidas de ratones heterocigotos para el CD4 humanizado descrito en el presente documento.

Ejemplo 2: Construcción y caracterización de ratones CD8 modificados genéticamente

10 La proteína CD8 se produce como un homodímero con enlace disulfuro (por ejemplo, un homodímero CD8 α) o un homomultímero de dos subunidades o como un heterodímero de dos proteínas, CD8 α (CD8a) y CD8 β (CD8b). Los genes CD8 α y CD8 β están colocalizados en el genoma, por ejemplo, en el cromosoma 6 del ratón, se encuentran a unos 37 kb de distancia unos de otros. Este vínculo tan estrecho hace que sea muy difícil generar un ratón modificado genéticamente que comprenda humanizaciones en los loci CD8 α y CD8 β por cruce. Por tanto, la dirección secuencial,

15 introduciendo primero un gen, por ejemplo, CD8 β , seguida de la introducción del segundo gen, por ejemplo, CD8 α , se realiza.

Ejemplo 2.1: Diseño por ingeniería de un locus CD8 β quimérico

20 El locus CD8b de ratón se humanizó en una única etapa mediante la construcción de un único vector director a partir de ADN de cromosoma artificial bacteriano (BAC) de humano y ratón usando la tecnología de VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la Patente de 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). El ADN de BAC RP23-431M6 fue modificado por BHR para generar un gran vector de direccionamiento (LTVEC), MAID 1737, para contener un

25 reemplazo de los exones del ratón 2-3 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 (Figura 3). Se insertó un casete loxp-Ub-Hyg en la unión 3' en el intrón 3. La secuencia de nucleótidos en varias uniones del vector resultante se enumeran en la Tabla 3 y se exponen en el Listado de Secuencias. La secuencia completa de aminoácidos de la proteína CD8 β humanizada se expone en la SEQ ID NO:53; con secuencias humanas que abarcan los aminoácidos 15-165 (establecidas en la SEQ ID NO:58).

Tabla 3. Secuencias de unión del vector de direccionamiento quimérico CD8 β

Unión	Secuencia	SEQ ID NO
Ratón/humano en el intrón 1	IGTTTGCTGTGACATGAACCTCATTTGTGACACAAACCCTGTGC TAGGGGGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCG CCC (TCGCAAGGGCCAGGCATATAAGTACACAATAAACAAATGG CAGCTCTCTCC)	17
Humano/5' del sitio lox en el intrón 3	(CCCCCTCCTTCCTTCCCCAGGCACTTTCCAAGTGTCAACTCTAG AGCCTAT) CGCGGCCGCAACCGGTATAACTTCGTATAATGTATGC TATACGAAGTTAT	18
3' del sitio lox/ratón en el intrón 3	ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGTTCGACGTAG CCTATTTCTCTAGATCCAAAATGATGACAAACAAAGGTACCTTG TG	19
Las secuencias humanas están entre paréntesis, los sitios lox están en cursiva y los sitios de enzimas de restricción, los sitios de clonación múltiple y las secuencias derivadas de vectores están en negrita.		

El vector de direccionamiento se electroporó en células ES de ratón F1H4 (Figura 5, lado izquierdo). Se identificaron células ES dirigidas a un locus CD8b humanizado mediante genotipado usando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela et al.) que detectó la presencia del gen CD8b humano. Los cebadores y las sondas usados en el ensayo se muestran en la Tabla 4 a continuación y se exponen en el Listado de Secuencias.

Tabla 4: Cebadores y sondas para genotipado de CD8 β quimérico

Región detectada	Ensayo	Cebador 5'	Cebador 3'	Sonda
Exón 2 de ratón	LOA	GCAGCTCTGCCCTCATTC AG (SEQ ID NO:20)	CATCTTTGCCGTAT GGTTGGT (SEQ ID NO:21)	CCCCCTCGTCCCTGC TGGTTCA (SEQ ID NO:22)
Exón 3 de ratón	LOA	CAAGAAGACTACCCTGAA GATGAAGA (SEQ ID NO:23)	TGTGAGTGCAACAA TGGAAACT (SEQ ID NO:24)	CGTCCCCCACCCAG AGACCCA (SEQ ID NO:25)
Exón 2 humano	GOA	GCCACCGAGCAGTGACAG T (SEQ ID NO:26)	TTCACCGTGGATAG TCCCTTTT (SEQ ID NO:27)	AGTTCCTGGCCCTCT GGGATTCGG (SEQ ID NO:28)
Exón 3 humano	GOA	TTGCTTTCTTTCTGTAGT TGATTCC (SEQ ID NO:29)	CCGGCACACTCTCT TCTTGAG (SEQ ID NO:30)	TCCCACCACTGCCCA GCCCCA (SEQ ID NO:31)

Hyg	GOA	TGCGGCCGATCTTAGCC (SEQ ID NO:32)	TTGACCGATTCTT GCGG (SEQ ID NO:33)	ACGAGCGGGTTCGGC CCATTC (SEQ ID NO:34)
LOA = pérdida de alelo; GOA = ganancia de alelo.				

Las células ES dirigidas anteriormente descritas 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 EE.UU. N.º 7.294.754 y Poueymirou et al. (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25(1):91-99). VELOCIMICE® (ratones F0 completamente derivados de la célula ES donadora) que portaban independientemente un gen CD8b quimérico se identificaron mediante genotipado usando un ensayo de modificación de alelo (Valenzuela *et al.*, *supra*) que detecta la presencia de las secuencias de gen de CD8b humanas únicas.

- El casete de selección puede retirarse mediante métodos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, las células ES que llevan el locus CD8b humano/ratón quimérico se pueden transfectar con un constructo que expresa Cre para retirar el casete de higromicina "loxed" introducido por la inserción de la construcción de direccionamiento que contiene secuencias del gen CD8b humano. El casete de higromicina puede retirarse opcionalmente cruzando ratones que expresan recombinasa Cre.
- Opcionalmente, el casete de higromicina queda retenido en los ratones. En una realización, el casete se eliminó para generar MAID 1739.

Ejemplo 2.2: Diseño por ingeniería de un locus CD8α quimérico

- El locus CD8α de ratón se humanizó en una única etapa mediante la construcción de un único vector director a partir de ADN de cromosoma artificial bacteriano (BAC) de humano y ratón usando la tecnología de VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 6.586.251 y Valenzuela et al., *supra*). El ADN de BAC RP23-431M6 fue modificado por BHR para generar un gran vector de direccionamiento (LTVEC), MAID 1738, para contener un reemplazo de los exones de ratón 1-2 que codifican el ectodominio CD8α (de la unión 5' en el codón 27 de Ala en el exón 1 de ratón a la unión 3' en el intrón 2 de ratón), con las secuencias humanas homólogas (de la unión 5' en el exón 2 humano a la unión 3' en el intrón 3 (Figura 4)). Esto conserva la secuencia líder del ratón al comienzo del exón 1. Se insertó un casete lox2372-Ub-Neo en la unión 3' de las secuencias de humano/ratón. Las secuencias de nucleótidos en diversas uniones del vector resultante se enumeran en la Tabla 5 y se exponen en el Listado de Secuencias. La secuencia completa de aminoácidos del polipéptido CD8α humanizado se expone en la SEQ ID NO: 54, abarcando la secuencia humana los aminoácidos 28-179 (establecidos en la SEQ ID NO: 59).

Tabla 5. Secuencias de unión del vector de direccionamiento quimérico CD8α

Unión	Secuencia	SEQ ID NO
Ratón/humano en el exón 1 (ratón) y exón 2 (humano)	TGAACCTGCTGCTGCTGGGTGAGTCGATTATCTTGGGGAGTGG AGAAGCT (AGGCCGAGCCAGTTCGGGTGTCGCCGCTGGATCG GACCTGGAACCTGGG)	35
Humano/5' del sitio lox 2372	(ATGCCAGGGACAGCCCTGATACTGTAGGTAGAGTCAAGGGCT GTCCAAGT) ACCGGTATAACTTCGTATAAGGTATCCTATACGA AGTTAT	36
3' del sitio lox 2372/ratón	ATAACTTCGTATAAGGTATCCTATACGAAGTTATCTCGACCTG ATCTTGGAGGGAGACCTGGACCGGGAGACGTGCTGGGGGCAGG GTT	37
Las secuencias humanas están entre paréntesis, los sitios lox están en cursiva y los sitios de enzimas de restricción, los sitios de clonación múltiple y las secuencias derivadas de vectores están en negrita.		

- El vector de direccionamiento CD8α humanizado descrito anteriormente se electroporó en células ES de ratón que contenían un locus CD8b humanizado para crear células ES modificadas que comprenden loci CD8b y CD8α humanizados (Figura 5). Se identificaron células ES dirigidas a un locus CD8α humanizado mediante genotipado usando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela et al.) que detectó la presencia del gen CD8α humano. Los cebadores y las sondas usados en el ensayo se muestran en la Tabla 6 a continuación y se exponen en el Listado de Secuencias.

Tabla 6: Cebadores y sondas para genotipado de CD8 α quimérico

Región detectada	Ensayo	Cebador 5'	Cebador 3'	Sonda
Exón 1 de ratón	LOA	GATGCTCTTGGCTCTT CCAGAA (SEQ ID NO:38)	ATGAAGCCATATAGAC AACGAAGGT (SEQ ID NO:39)	CCAGCTCCAACTCCC CCAGCC (SEQ ID NO:40)
Exón 2 de ratón	LOA	TCAGCCCCAGAGACCA GAAG (SEQ ID NO:41)	TCAATCGCTTGAGAGC ACCTAA (SEQ ID NO:42)	TTGTGGCCCCCGTGGC TCA (SEQ ID NO:43)
Exón 2 humano	GOA	GCGGTCTCTCGGGCAAG A (SEQ ID NO:44)	TCAGGGCCGAGCAGAA ATAG (SEQ ID NO:45)	ACACCTTCGTCCTCAC CCTGAGCGA (SEQ ID NO:46)
Intrón 2 humano	GOA	GCTTCACCTCAACCTG TTTCC (SEQ ID NO:47)	CGCTTCAGGTGCGCT AA (SEQ ID NO:48)	ACCTGGGCCCTGCTTT CAAGCC (SEQ ID NO:49)
Neo	GOA	GGTGGAGAGGCTATTC GGC (SEQ ID NO:50)	GAACACGGCGGCATCA G (SEQ ID NO:51)	TGGGCACAACAGACAA TCGGCTG (SEQ ID NO:52)

LOA = pérdida de alelo; GOA = ganancia de alelo.

5 Las células ES dirigidas anteriormente descritas 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 EE.UU. N.º 7.294.754 y Poueymirou et al., *supra*). VELOCIMICE® (ratones F0 completamente derivados de la célula ES donadora) que portaban un gen CD8b quimérico y un gen CD8a quimérico se identificaron mediante genotipado usando un ensayo de modificación de alelo (Valenzuela *et al.*, *supra*) que detecta la presencia de las secuencias de gen de CD8b y CD8a humanas únicas.

10 Como alternativa, el vector de direccionamiento CD8a humanizado descrito en el presente documento se electroporó en células ES de ratón que no contienen un locus CD8b humanizado para generar un ratón que comprende un locus CD8a humanizado solamente.

15 El casete de selección en el locus CD8a puede retirarse mediante métodos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 2.1 anterior. En una realización, el casete de selección se eliminó para generar el ratón MAID 1740.

Ejemplo 2.3: Expresión de CD8 quimérico en ratones genéticamente modificados

20 Los ratones heterocigotos para los genes CD8a humanizados (MAID 1740) y CD8b (MAID 1739) se analizaron para determinar la expresión de CD8 humano.

La expresión de CD8a y CD8b humanos fue claramente detectable en la superficie de las células T CD3+CD4- derivadas de los bazo de animales heterocigotos pero no de tipo silvestre (Figura 6).

25 La expresión de CD8a y CD8b humanos también fue detectable en la superficie de timocitos obtenidos de animales heterocigotos pero no de tipo silvestre (Figura 7).

REIVINDICACIONES

1. Una célula de roedor modificada genéticamente que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/roedor quimérico que comprende al menos dominios D1, D2 y D3 de un polipéptido CD4 humano y al menos dominios D4, transmembrana y citoplasmático de un polipéptido CD4 de roedor, en donde la célula de roedor modificada genéticamente es una célula T y expresa el polipéptido CD4 humano/roedor quimérico, y en donde el polipéptido CD4 humano/roedor quimérico es capaz de interactuar con una proteína MHC II humana o humanizada.
2. La célula de roedor modificada genéticamente de la reivindicación 1, en donde la célula T no expresa un correceptor CD4 de roedor endógeno funcional a partir de su locus CD4 endógeno.
3. La célula de roedor modificada genéticamente de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la célula T no expresa CD8.
4. Una célula de roedor modificada genéticamente que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/roedor quimérico que comprende al menos dominios D1, D2 y D3 de un polipéptido CD4 humano y al menos dominios D4, transmembrana y citoplasmático de un polipéptido CD4 de roedor, en donde la célula de roedor modificada genéticamente es una célula madre embrionaria (ES).
5. La célula de roedor modificada genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/roedor quimérico está presente en un locus correceptor CD4 de roedor endógeno.
6. La célula de roedor modificada genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la célula de roedor es una célula de rata.
7. La célula de roedor modificada genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la célula de roedor es una célula de ratón.
8. La célula de ratón de la reivindicación 7, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CD4 humano/roedor quimérico codifica un polipéptido CD4 humano/ratón quimérico y está unida operativamente a secuencias promotoras y reguladoras CD4 endógenas de ratón.
9. Un embrión de roedor desarrollado a partir de la célula madre embrionaria de roedor de una cualquiera de las reivindicaciones 4-8.
10. Un tejido de roedor que comprende la célula T de roedor de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-8.

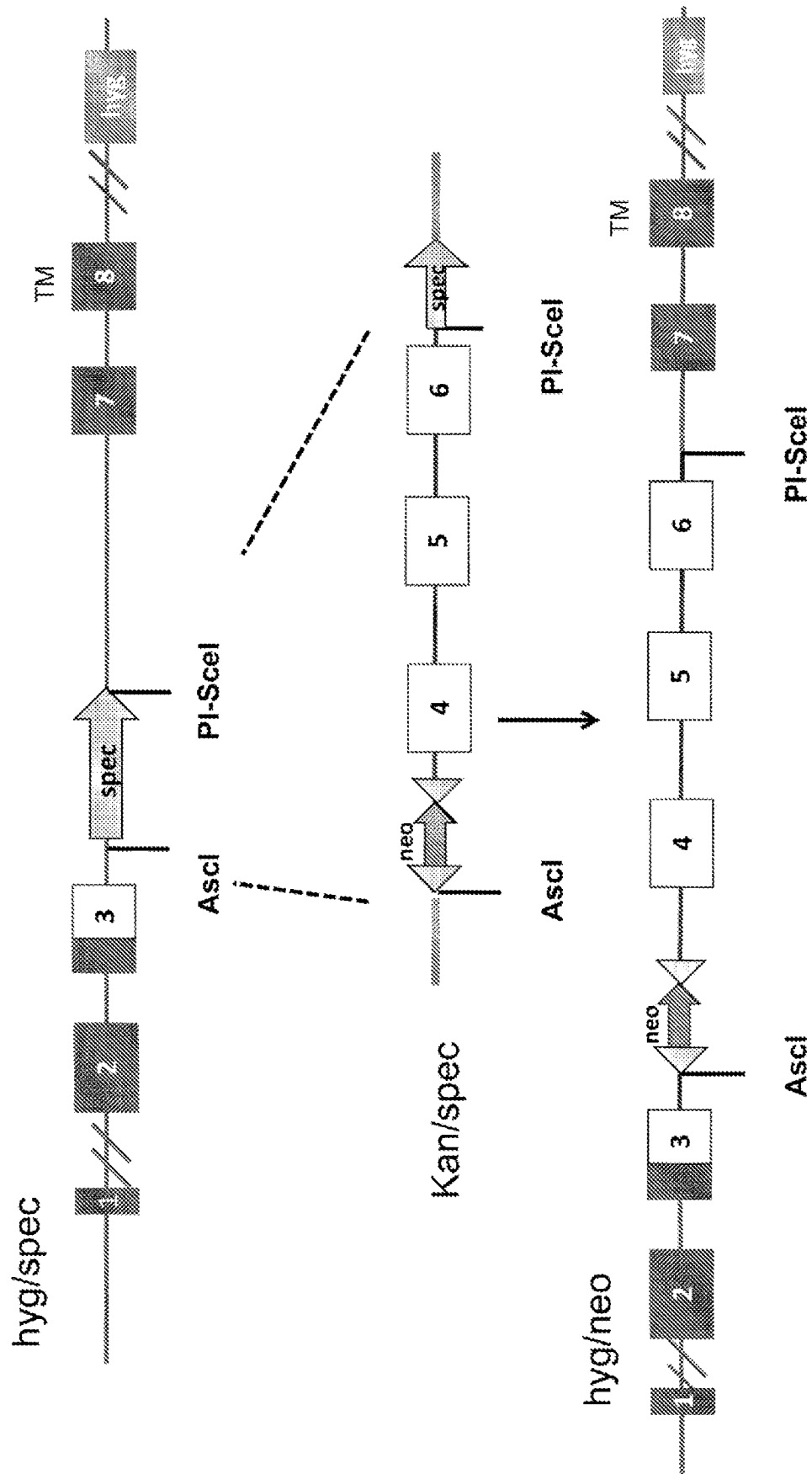


FIG. 1

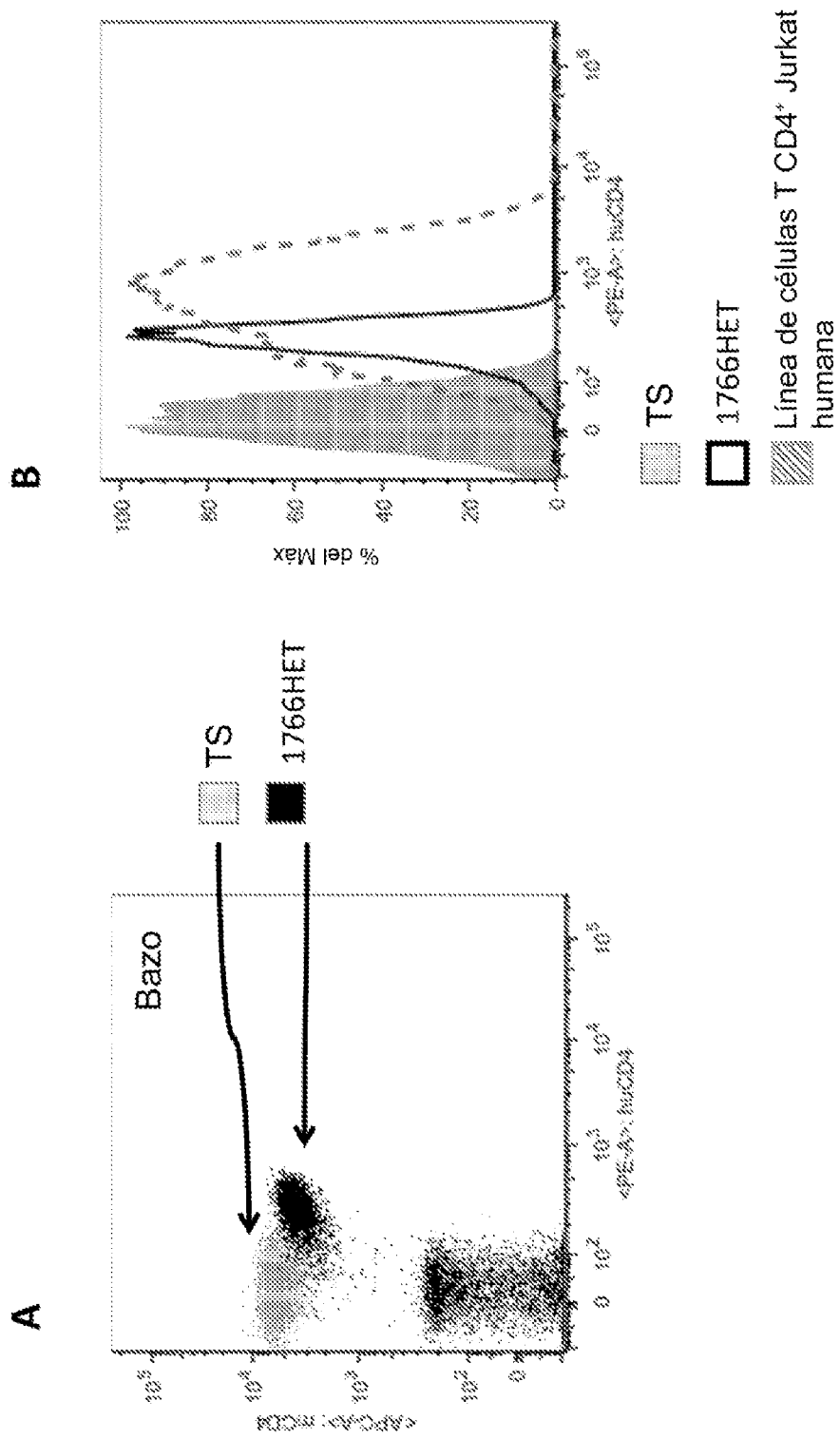


FIG. 2



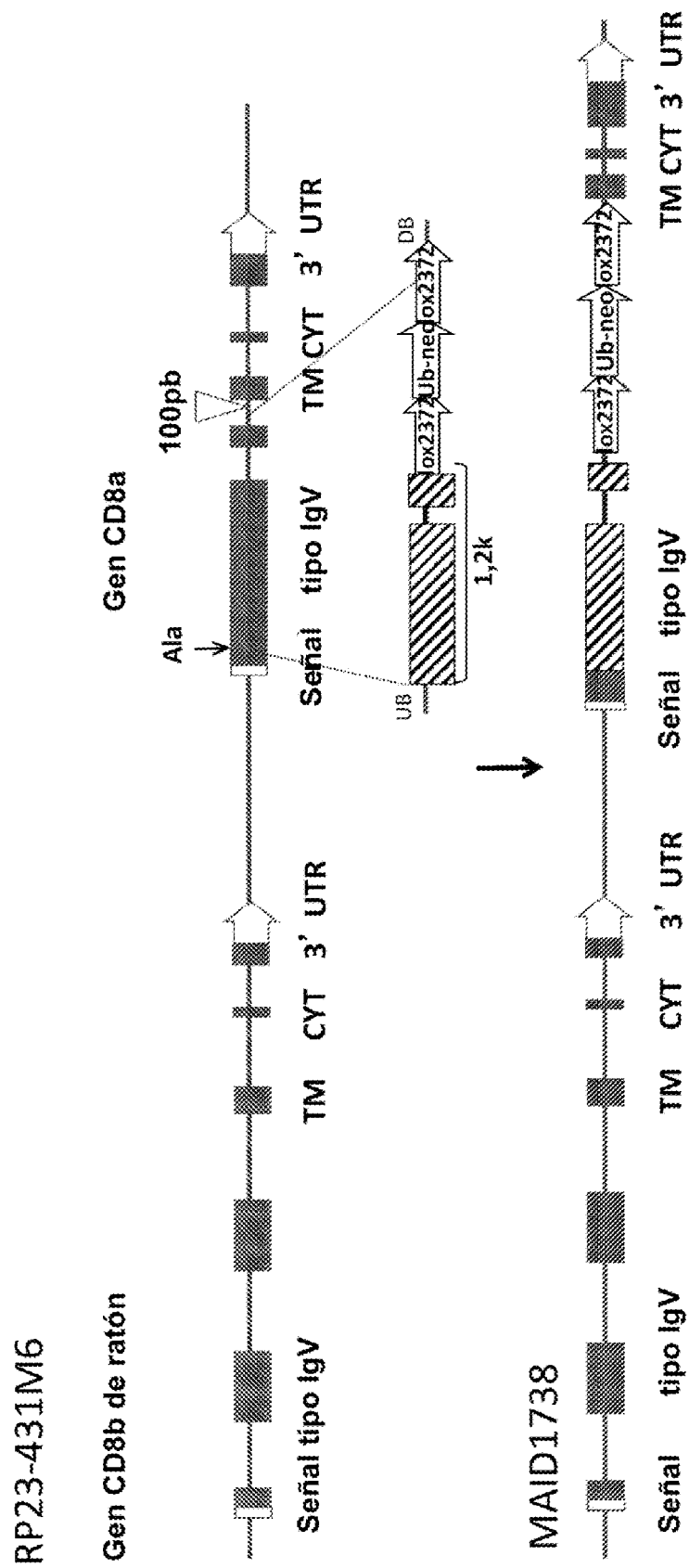


Fig. 4

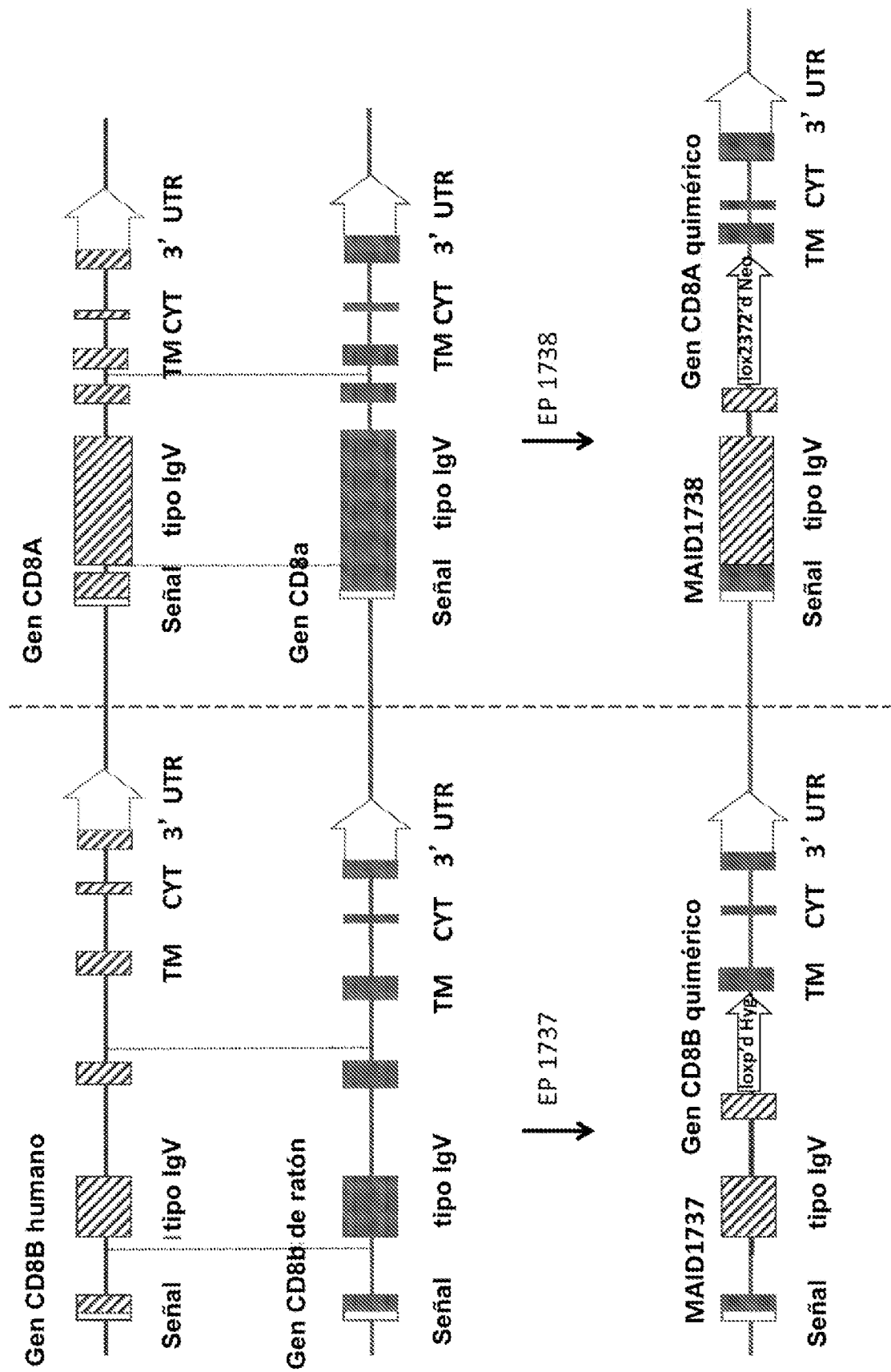


FIG. 5

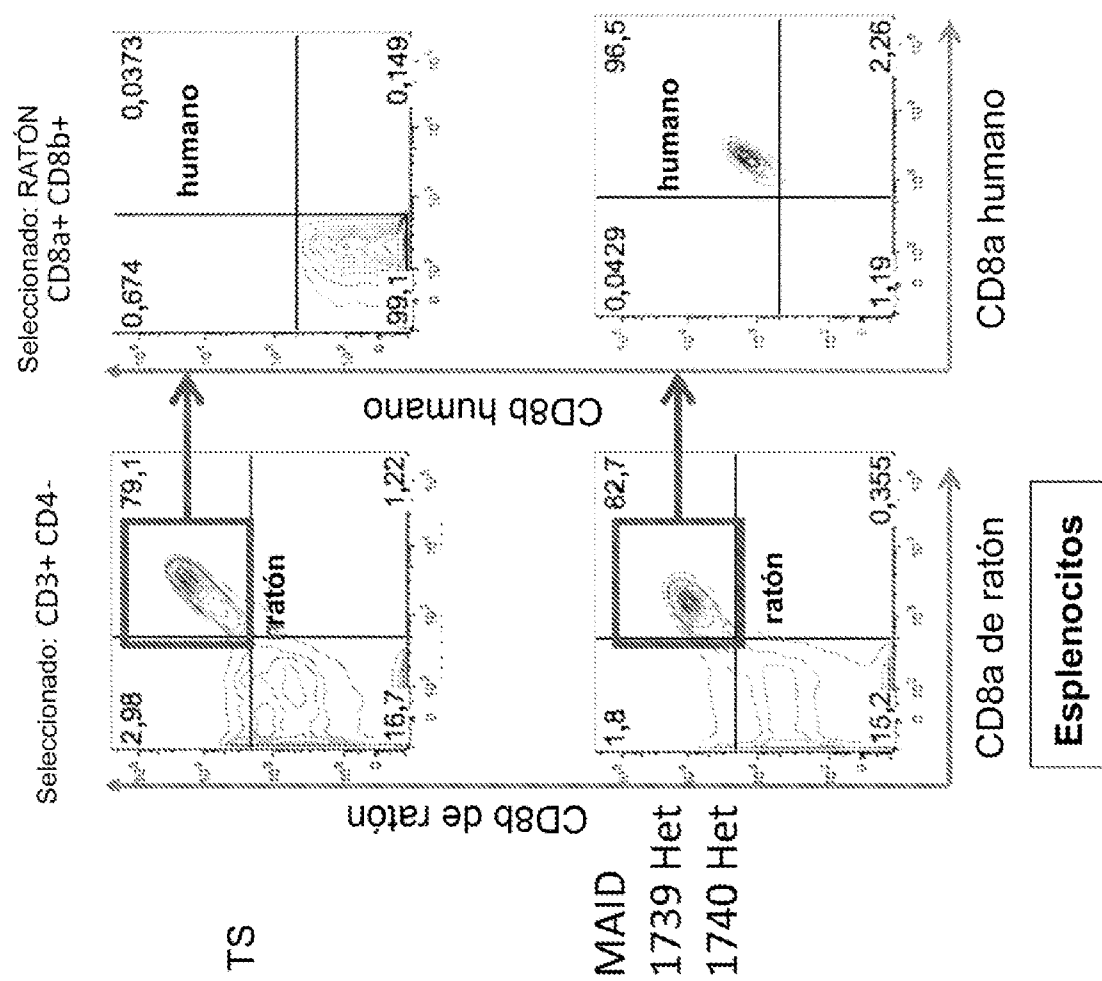


FIG. 6

