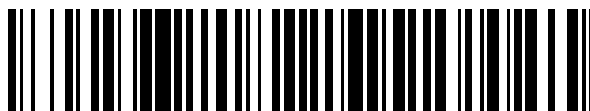


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 844 000**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2015 PCT/US2015/062229**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.06.2016 WO16085889**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2015 E 15808501 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.10.2020 EP 3223605**

54 Título: **Animales no humanos que expresan el complejo CD3 humanizado**

30 Prioridad:

24.11.2014 US 201462083653 P

23.01.2015 US 201562106999 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.07.2021

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)

777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

OLSON, KARA L.;
SMITH, ERIC;
LAI, KA-MAN VENUS;
MURPHY, ANDREW J.;
THURSTON, GAVIN y
GUO, DAYONG

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 844 000 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

Animales no humanos que expresan el complejo CD3 humanizado

5 **Campo de la invención**

Se proporciona un ratón genéticamente modificado, que comprende en su genoma una secuencia de ácido nucleico que codifica un CD3 ϵ humanizado, un CD3 δ humanizado y un CD3 γ humanizado. Por tanto, se proporcionan ratones genéticamente modificados que expresan el complejo CD3 humanizado. Se proporciona también en el presente documento un modelo para ensayos preclínicos de agentes terapéuticos basados en CD3, por ejemplo, anticuerpos basados en CD3, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos basados en CD3.

Antecedentes de la invención

15 Además de las subunidades receptoras de linfocitos T, por ejemplo, TCR α y TCR β muy variables, el complejo receptor de linfocitos T sobre la superficie de un linfocito T comprende las cadenas invariantes CD3 ϵ , CD3 δ y CD3 γ , que forman heterodímeros que consisten en CD3 $\epsilon\delta$ y CPB3 $\epsilon\gamma$. Asociada también con el complejo TCR/CD3 está la cadena ζ , que está presente como homodímero unido a disulfuro.

20 Las cadenas de CD3 juegan un papel crucial en el ensamblaje del receptor de linfocitos T, el transporte a la superficie celular, la endocitosis de los receptores superficiales, el desarrollo de linfocitos T, y la señalización de linfocitos T. Por ejemplo, se ha demostrado a través de estudios de deficiencias de diversas subunidades de CD3, que las cadenas de CD3 son importantes para la transición de linfocitos T de doble negativo (CD4-CD8- o DN) a doble positivo (CD4+CD8+ o DP) a un único positivo (CD4+ o CD8+ o SP). Además, cada una de las cadenas CD3 ϵ , CD3 δ y CD3 γ contiene un motivo de activación basado en la tirosina inmunorreceptora (ITAM) mientras que el dímero de la cadena ζ contiene 6 ITAM totales. Estos motivos sirven como módulos de señalización, y se fosforilan mediante las quinasas asociadas tras la participación del TCR.

30 Los anticuerpos contra CD3 han mostrado agrupar CD3 sobre los linfocitos T, produciendo por tanto la activación de los linfocitos T de una manera similar a la participación de los TCR por las moléculas MHC cargadas de péptidos. Por tanto, se han propuesto anticuerpos dirigidos contra CD3 como candidatos terapéuticos destinados a la activación de los linfocitos T. Además, se han propuesto anticuerpos biespecíficos con capacidad de unión a CD3 y un antígeno diana para usos terapéuticos que implican el direccionamiento de las respuestas inmunitarias de los linfocitos T a tejidos y células que expresan el antígeno diana.

35 Es particularmente deseado un modelo animal conveniente para el ensayo preclínico de anticuerpos terapéuticos monoespecíficos y biespecíficos basados en CD3.

40 El documento WO2003/006639 divulga un animal transgénico que comprende un polipéptido humano implicado en el reconocimiento y/o la activación antigénica por linfocitos T. U. Kuhn *et al.*, *Sci Transl Med.* 3(68):68ra10 (2011), divulga ratones transgénicos que expresan la cadena s humana del complejo CD3.

Sumario de la invención

45 Se proporciona en el presente documento un ratón modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 1. El locus CD3 endógeno de ratón está genéticamente modificado para codificar un dominio extracelular de CD3 ϵ humana, un dominio extracelular de CD3 δ humana y un dominio extracelular de CD3 γ humana. El locus CD3 endógeno de ratón está genéticamente modificado de tal manera que no expresa el dominio o dominios extracelulares de la proteína o proteínas de ratón correspondientes. En una realización, el locus CD3 endógeno de ratón codifica además los dominios transmembrana y citoplásmico de la proteína o proteínas endógenas CD3 de ratón correspondientes, en donde el animal expresa una proteína CD3 quimérica sobre la superficie de sus linfocitos T que comprende el dominio extracelular de la proteína CD3 humana y los dominios transmembrana y citoplásmico de la proteína CD3 endógena de ratón. En una realización, la secuencia o secuencias de ácidos nucleicos que codifica(n) el dominio extracelular de CD3 humano en el ratón se une de manera operativa a la secuencia o secuencias de ácidos nucleicos que codifica(n) los dominios transmembrana y citoplásmico de la proteína o proteínas CD3 endógenas de ratón correspondientes. En una realización particular, el animal no humano comprende (a) en un locus CD3 ϵ endógeno, una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de una CD3 ϵ humana unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica los dominios transmembrana y citoplásmico de CD3 ϵ endógena de ratón, (b) en el locus CD3 δ endógeno, una secuencia de ácido nucleico codifica un dominio extracelular de CD3 δ humana unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica los dominios transmembrana y citoplásmico de una CD3 δ endógena de ratón, y (c) en un locus CD3 γ endógeno, una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de una CD3 γ humana unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica los dominios transmembrana y citoplásmico de una CD3 γ endógena de ratón, en donde el ratón expresa las proteínas CD3 ϵ , CD3 δ y CD3 γ quiméricas, sobre la superficie de sus linfocitos T. En algunas realizaciones, el dominio extracelular de la proteína CD3 humana del ratón comprende la secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 35. En algunas realizaciones, el ratón comprende dominios extracelulares de las proteínas CD3

humanas que comprenden las secuencias de las SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 35.

En algunas realizaciones, el animal no humano genéticamente modificado descrito en el presente documento comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de la proteína CD3 humana unido operativamente a un promotor CD3. Por tanto, en algunas realizaciones, el ratón descrito en el presente documento comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio extracelular de una CD3 ϵ humana, unido operativamente a un promotor CD3, un dominio extracelular de CD3 δ humana, unido operativamente a un promotor CD3 y un dominio extracelular de CD3 γ humana unido operativamente a un promotor CD3. En una realización, el promotor CD3 es un promotor CD3 de un animal no humano. En una realización, el promotor CD3 es un promotor CD3 humano. En una realización, el promotor CD3 es un promotor CD3 endógeno de ratón.

Por tanto, en una realización, se proporciona en el presente documento un ratón genéticamente modificado, en donde el ratón comprende (a) en un locus CD3 ϵ endógeno de ratón, una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de una CD3 ϵ humana unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica los dominios transmembrana y citoplásmico de una CD3 ϵ endógena de ratón, (b) en el locus CD3 δ endógeno de ratón, una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de CD3 δ humana unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica los dominios transmembrana y citoplásmico de una CD3 δ endógena de ratón, y (c) en un locus CD3 γ endógeno de ratón, una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de una CD3 γ humana unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica los dominios transmembrana y citoplásmico de una CD3 γ endógena de ratón, y el ratón expresa las proteínas CD3 ϵ , CD3 δ y CD3 γ humanizadas sobre la superficie de sus linfocitos T. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la proteína CD3 ϵ humanizada en dicho ratón se muestra en la SEQ ID NO: 24, la secuencia de aminoácidos de la proteína CD3 δ humanizada se muestra en la SEQ ID NO: 25, y la secuencia de aminoácidos de la proteína CD3 γ humanizada se muestra en la SEQ ID NO: 26. En una realización, el ratón genéticamente modificado proporcionado en el presente documento comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de la CD3 humana unida operativamente a un promotor CD3. En una realización, el promotor es un promotor CD3 endógeno de ratón. En otra realización, el ratón genéticamente modificado proporcionado en el presente documento comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de la CD3 humana unido operativamente a un promotor CD3. En una realización, el ratón muestra una relación celular CD4+ a CD8+ similar en el timo en comparación con un ratón que no está genéticamente modificado para expresar proteínas CD3 humanizadas. En una realización, el ratón muestra una relación linfocitos T CD4+ a linfocitos T CD8+ en el timo que está dentro del 30 %, dentro del 25 %, dentro del 20 %, dentro del 15 %, dentro del 12 %, dentro del 10 %, dentro del 5 % o dentro del 2 % de la relación CD4+ a CD8+ de un ratón que no está genéticamente modificado para expresar proteínas CD3. En una realización, el ratón muestra porcentajes de linfocitos T y B similares en el bazo, ganglios linfáticos y sangre periférica como un ratón que no está genéticamente modificado para expresar proteínas CD3 humanizadas. En una realización, el ratón muestra cantidades similares en circulación de glóbulos blancos, linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, y basófilos como un ratón que no está genéticamente modificado para expresar proteínas CD3 humanizadas.

Se divulga en el presente documento un ratón genéticamente modificado que comprende, en un locus CD3 endógeno de ratón, una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de una proteína CD3 humana, en donde la proteína CD3 humana se selecciona del grupo que consiste en CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ , CD3 ζ , y una combinación de las mismas. El ratón de la invención comprende dominios extracelulares de CD3 ϵ , CD3 δ y CD3 γ humanas. En una realización del ratón, el dominio extracelular de CD3 ϵ humana se muestra en la SEQ ID NO: 33, el dominio extracelular de CD3 δ humana se muestra en la SEQ ID NO: 34, y el dominio extracelular de CD3 γ humanizada se muestra en la SEQ ID NO: 35. El ratón expresa una CD3 ϵ humanizada, una CD3 δ humanizada y una CD3 γ humanizada. En una realización del ratón, la CD3 ϵ humanizada se muestra en la SEQ ID NO: 24, una CD3 δ humanizada se muestra en la SEQ ID NO: 25 y la CD3 γ humanizada se muestra en la SEQ ID NO: 26. El ratón comprende además los dominios transmembrana y citoplásmico de CD3 ϵ , CD3 δ y CD3 γ . En una realización, el ratón comprende además los dominios transmembrana y citoplásmico endógenos de CD3 ϵ , CD3 δ y CD3 γ .

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un método para preparar un ratón genéticamente modificado que expresa una proteína CD3 humanizada, de acuerdo con la reivindicación 7. En una realización del método, el animal no comprende uno o más dominios extracelulares funcionales de la proteína o proteínas de ratón correspondientes. En el método, el animal comprende, en el locus CD3 endógeno, una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de CD3 ϵ humana, un dominio extracelular de CD3 δ humana y un dominio extracelular de CD3 γ humana. En una realización del método, el dominio extracelular de CD3 ϵ humana se muestra en la SEQ ID NO: 33, el dominio extracelular de CD3 δ humana se muestra en la SEQ ID NO: 34, y el dominio extracelular de CD3 γ humanizada se muestra en la SEQ ID NO: 35. En una realización del método, el animal no comprende uno o más dominios extracelulares funcionales de la proteína o proteínas de ratón correspondientes. En una realización particular, el método comprende sustituir, en el locus CD3 endógeno, un dominio extracelular de una o más proteínas CD3 no humanas por un dominio extracelular correspondiente de una o más proteínas CD3 humanas. En una realización del método, el animal comprende además una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican además los dominios transmembrana y citoplásmico de la proteína o proteínas endógenas CD3 correspondientes. En una realización del método, la sustitución es en el locus CD3 endógeno de ratón. En una realización, el ratón expresa una proteína CD3 humanizada seleccionada entre el grupo que consiste en la CD3 ϵ humanizada que se muestra en la SEQ ID NO: 24, una CD3 δ humanizada que se muestra en la SEQ ID NO: 25, una CD3 γ humanizada que se muestra

en la SEQ ID NO: 26, y una combinación de las mismas. En una realización del método, la sustitución se realiza en una célula ES individual, y la célula ES única se introduce en el embrión de ratón para generar un ratón.

5 En otro aspecto más, se proporciona en el presente documento un modelo de ratón, por ejemplo, un modelo de ratón para ensayar una proteína de unión a antígeno biespecífica basada en CD3, en donde la proteína de unión a antígeno tiene capacidad de unión a CD3 y a un antígeno de interés, comprendiendo el modelo de ratón un ratón genéticamente modificado para codificar un dominio extracelular de la proteína CD3 humana, en donde la proteína CD3 humana es CD3ε, CD3δ y CD3γ, y que comprende la célula que expresa o comprende el antígeno no de ratón de interés. En una realización del modelo de ratón, la una o más secuencias de ácidos nucleicos de la proteína o proteínas CD3
10 humanizadas se localiza en el locus CD3 endógeno. En una realización del modelo de ratón, la proteína de unión a antígeno se ha introducido en dicho ratón. el ratón expresa los dominios extracelulares CD3ε, CD3δ y CD3γ. En un modelo de ratón, el ratón expresa además los dominios transmembrana y citoplásmico de CD3ε, CD3δ y CD3γ.

15 En una realización del modelo de ratón, el ratón comprende un xenoinjerto de un tumor que expresa el antígeno de interés. En una realización del modelo de ratón, la célula que expresa o que comprende el antígeno de interés es una célula tumoral. En una realización del modelo de ratón, la proteína de unión a antígeno biespecífica seleccionada se une a la proteína CD3 humanizada y al antígeno de interés. En una realización del modelo de ratón, el antígeno de interés es un antígeno humano. En una realización del modelo de ratón, la proteína de unión a antígeno tiene capacidad de unión a la proteína CD3 de mono. En una realización del modelo de ratón, el antígeno de interés es un antígeno asociado a tumor. En dicha realización, el antígeno asociado a tumor puede seleccionarse entre el grupo que
20 consiste en ALK, proteínas BAGE, BIRC5 (survivina), BIRC7, CA9, CALR, CCR5, CD19, CD20 (MS4A1), CD22, CD27, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44, CD52, CD56, CD79, CDK4, CEACAM3, CEACAM5, CLEC12A, EGFR, EGFR variante III, ERBB2 (HER2), ERBB3, ERBB4, EPCAM, EPHA2, EPHA3, FCRL5, FLT3, FOLR1, proteínas GAGE, GD2, GD3, GPNMB, GM3, GPR112, IL3RA, KIT, KRAS, LGR5, LMP2 derivada de VEB, L1CAM, proteínas MAGE, MLANA,
25 MSLN, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, MUC16, MUM1, ANKRD30A, NY-ESO1 (CTAG1B), OX40, PAP, PAX3, PAX5, PLAC1, PRLR, PMEL, PRAME, PSMA (FOLH1), proteínas RAGE, RET, RGS5, ROR1, SART1, SART3, SLAMF7, SLC39A6 (LIV1), STEAP1, STEAP2, *TERT*, TMPRSS2, nuevo antígeno de Thompson, TNFRSF17, TYR, UPK3A, VTCN1, WT1.

30 En otra realización, el antígeno de interés es un antígeno asociado a una enfermedad infecciosa. En dicha realización, el ratón puede infectarse con un agente infeccioso. En una de dichas realizaciones, el antígeno asociado a enfermedad infecciosa puede ser un antígeno vírico y el antígeno vírico se selecciona entre el grupo que consiste en VIH, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, virus del herpes (por ejemplo, VHS-1, VHS-2, CMV, VHA-6, VVZ, virus de Epstein Barr), adenovirus, virus de la gripe, flavivirus, ecovirus, rinovirus, virus coxsackie, coronavirus, virus respiratorio sincitial, virus de las paperas, rotavirus, virus del sarampión, virus de la rubeola, parvovirus, virus vaccinia, HTLV, virus del dengue,
35 virus del papiloma, virus de molusco, poliovirus, virus de la rabia, virus JC, virus del ébola, y antígeno del virus de la encefalitis arboviral. En otra de dichas realizaciones, el antígeno asociado a la enfermedad infecciosa puede ser un antígeno bacteriano y el antígeno bacteriano se selecciona entre el grupo que consiste en clamidia, rickettsia, micobacterias, estafilococos, estreptococos, neumococos, meningococos, gonococos, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionella, difteria, salmonela, bacilos, cólera, tétanos, botulismo, ántrax, peste, leptospira, y antígeno bacteriano de la enfermedad de Lyme.

45 En una realización del modelo de ratón proporcionado, la proteína de unión a antígeno basada en CD3 es un anticuerpo. En una realización, la proteína de unión a antígeno basada en CD3 es una proteína de unión a antígeno humana o humanizada. Dicho modelo de ratón puede permitir ensayar la eficacia y/o la toxicidad de la proteína de unión a antígeno en el ratón.

50 Se proporciona también en el presente documento un método de cribado de un fármaco candidato que se dirige a un antígeno de interés que comprende (a) introducir el antígeno de interés en un ratón genéticamente modificado que comprende un locus CD3 endógeno de ratón genéticamente modificado para codificar un dominio extracelular de una proteína CD3 humana, en donde la proteína CD3 humana es CD3ε, CD3δ y CD3γ, (b) poner en contacto el ratón con un fármaco candidato de interés, en donde el fármaco candidato se dirige contra la CD3 humana y el antígeno de interés, y (c) determinar si el fármaco candidato es eficaz en la prevención, la reducción o la eliminación de células caracterizadas por la presencia o la expresión del antígeno de interés. En el método, el ratón genéticamente modificado
55 comprende en el locus CD3 endógeno de ratón una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de CD3ε humana, un dominio extracelular de CD3δ humana y un dominio extracelular de CD3γ humana. En una realización del método, el ratón no comprende un dominio extracelular funcional de las proteínas de ratón correspondientes. En el método, el ratón comprende además una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican además los dominios transmembrana y citoplásmico de la proteína o proteínas endógenas CD3 de ratón correspondientes. En el método, la secuencia o secuencias de ácidos nucleicos que codifican el dominio extracelular de CD3 humana se une de manera operativa a la secuencia o secuencias de ácidos nucleicos que codifican los dominios transmembrana y citoplásmico de la proteína o proteínas CD3 endógenas de ratón correspondientes. En una realización del método, el dominio extracelular de una CD3ε humana se muestra en la SEQ ID NO: 33, el dominio extracelular de CD3δ humana se muestra en la SEQ ID NO: 34, y el dominio extracelular de CD3γ humana se muestra
65 en la SEQ ID NO: 35. Por tanto, En una realización particular del método, el ratón expresa una proteína CD3ε humanizada que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 24, una proteína CD3δ

humanizada que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 25, y una proteína CD3 γ humanizada que comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 26.

5 En una realización particular del método de cribado de fármacos candidatos descritos en el presente documento, la etapa de introducir el antígeno de interés en el ratón descrito en el presente documento comprende expresar en el ratón el antígeno de interés. En una realización, la etapa de expresar en el ratón el antígeno de interés comprende modificar genéticamente el ratón para expresar el antígeno de interés. En una realización, la etapa de introducir el antígeno de interés comprende infectar el ratón con el antígeno de interés. En una realización del método, la etapa de introducción comprende introducir en dicho ratón una célula que exprese el antígeno de interés. En diversas realizaciones del método, la célula puede ser una célula tumoral, una célula bacteriana, o una célula infectada con un virus. Por tanto, En algunas realizaciones del método, el ratón comprende una infección que es tanto una infección vírica como bacteriana. Por tanto, el antígeno de interés puede ser un antígeno asociado a una enfermedad infecciosa. En una realización, el antígeno de interés es un antígeno vírico, y el antígeno vírico se selecciona entre el grupo que consiste en VIH, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, virus del herpes (por ejemplo, VHS-1, VHS-2, CMV, VHA-6, VVZ, virus de Epstein Barr), adenovirus, virus de la gripe, flavivirus, ecovirus, rinovirus, virus coxsackie, coronavirus, virus respiratorio sincitial, virus de las paperas, rotavirus, virus del sarampión, virus de la rubeola, parvovirus, virus vaccinia, HTLV, virus del dengue, virus del papiloma, virus de molusco, poliovirus, virus de la rabia, virus JC, virus del ébola, y antígeno del virus de la encefalitis arboviral. En otra realización, el antígeno de interés es un antígeno asociado a una enfermedad infecciosa, que es antígeno bacteriano seleccionado entre el grupo que consiste en clamidia, rickettsia, micobacterias, estafilococos, estreptococos, neumonococos, meningococos, gonococos, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionella, difteria, salmonela, bacilos, cólera, tétanos, botulismo, ántrax, peste, leptospira, y antígeno bacteriano de la enfermedad de Lyme.

25 En otra realización del método de cribado de fármacos candidatos, el antígeno de interés es un antígeno asociado a tumor. En una realización del método, el antígeno asociado a tumor se selecciona entre el grupo que consiste en ALK, proteínas BAGE, BIRC5 (survivina), BIRC7, CA9, CALR, CCR5, CD19, CD20 (MS4A1), CD22, CD27, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44, CD52, CD56, CD79, CDK4, CEACAM3, CEACAM5, CLEC12A, EGFR, EGFR variante III, ERBB2 (HER2), ERBB3, ERBB4, EPCAM, EPHA2, EPHA3, FCRL5, FLT3, FOLR1, proteínas GAGE, GD2, GD3, GPNMB, GM3, GPR112, IL3RA, KIT, KRAS, LGR5, LMP2 derivada de VEB, L1CAM, proteínas MAGE, MLANA, MSLN, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, MUC16, MUM1, ANKRD30A, NY-ESO1 (CTAG1B), OX40, PAP, PAX3, PAX5, PLAC1, PRLR, PMEL, PRAME, PSMA (FOLH1), proteínas RAGE, RET, RGS5, ROR1, SART1, SART3, SLAMF7, SLC39A6 (LIV1), STEAP1, STEAP2, *TERT*, TMPRSS2, nuevo antígeno de Thompson, TNFRSF17, TYR, UPK3A, VTCN1, WT1.

35 En algunas realizaciones del método de cribado de fármacos candidatos, el ratón es un ratón inmunocompetente. En algunas realizaciones del método que se describe en el presente documento, el antígeno de interés es un antígeno de interés humano.

40 En algunas realizaciones del método, el fármaco candidato es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el fármaco candidato es una proteína de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el fármaco candidato es un anticuerpo biespecífico o una proteína de unión a antígeno biespecífica. En algunas realizaciones, la proteína de unión a antígeno biespecífica tiene capacidad de unión a la proteína CD3 humana y al antígeno de interés. En una realización, el fármaco candidato es capaz de reconocer una proteína CD3 de mono.

45 En algunas realizaciones del método de cribado de fármacos candidatos, el fármaco candidato puede reducir, eliminar o prevenir el crecimiento del tumor en comparación con un agente que no se dirige al antígeno de interés. En algunas realizaciones de dicho método, la etapa de determinar si el fármaco candidato es eficaz en la prevención, reducción o eliminación de células caracterizadas por la presencia o expresión del antígeno de interés comprende un ensayo del volumen tumoral o un ensayo de destrucción de células tumorales mediado por linfocitos T.

50 En otras realizaciones, el fármaco candidato puede reducir, eliminar o prevenir la infección bacteriana o vírica en comparación con un agente que no se dirige al antígeno de interés. En algunas de dichas realizaciones, la etapa de determinar si el fármaco candidato es eficaz en la prevención, reducción o eliminación de células caracterizadas por la presencia o expresión del antígeno de interés comprende la medición de los títulos víricos o bacterianos.

55 Se divulga en el presente documento un modelo de ratón, para ensayar la seguridad, la eficacia, y la farmacocinética de las terapias combinadas de fármacos en donde la terapia combinada incluye un fármaco, por ejemplo, una proteína de unión a antígeno, que se une a una molécula CD3 humana. Dichas terapias combinadas tienen como objetivo el direccionamiento a tumores, infecciones, u otras enfermedades específicas descritas en el presente documento que se pueden beneficiar del alistamiento y/o la activación de linfocitos T.

60 **Breve descripción de los dibujos**

65 La **FIG. 1** representa la estructura del complejo receptor de linfocitos T. El complejo comprende dos subunidades CD3 ϵ , una subunidad CD3 δ , una subunidad CD3 γ y dos subunidades CD3 ζ , complejadas con el heterodímero TCR $\alpha\beta$ sobre la superficie de un linfocito T. Los asteriscos indican las localizaciones de los motivos ITAM. Las **FIGS. 2A y B** son la representación esquemática (no a escala) del vector de direccionamiento CD3 $\gamma\delta\epsilon$ grande

humanizado. La **FIG. 2A** representa el vector de direccionamiento grande antes de la delección del casete de selección (Neo), con las secuencia CD3E, CD3D y CD3G humanas inactivadas en las localizaciones indicadas. A, B, C, D, E, F y G indican la localización de la unión de las secuencias de ácidos nucleicos representadas en la Tabla 1. La **FIG. 2B** representa el vector de direccionamiento grande después de la delección del casete de selección (Neo); de manera similar a la FIG. 2A, se indican las localizaciones de las CD3E, CD3D y CD3G humanas. A-B, C, D, E, F, y G son las localizaciones de la unión de las secuencias de ácidos nucleicos representadas en las Tablas 1 y 3.

La **FIG. 3** representa las secuencias de aminoácidos de las proteínas CD3 humanizadas en los ratones CD3 $\gamma\delta\epsilon$ humanizados. Las secuencias de la proteína CD3 de origen humano están subrayadas.

La **FIG. 4** representa alineamientos entre las secuencias CD3e, CD3d, y CD3g de ratón y humana. Los extremos 5' y 3' de las secuencias humanas que se introdujeron en los loci CD3 de ratón están marcadas con * y **, respectivamente.

La **FIG. 5A**, fila superior, es un gráfico de un análisis FACS que demuestra una distribución normal de timocitos CD4+ y CD8+ en ratones de tipo silvestre (WT), ratones CD3 $\gamma\delta\epsilon$ heterocigóticos humanizados (HET) o ratones CD3 $\gamma\delta\epsilon$ homocigóticos humanizados (HO). La **Fig. 5B**, fila superior, son datos que representan porcentajes así como cantidades de linfocitos B y T en sangre periférica de los animales indicados. La **Fig. 5B** fila superior son datos que representan porcentajes de linfocitos T y B en el bazo de los animales indicados. La **FIG. 5C** muestra la policlonalidad del repertorio V β en linfocitos T CD4+ y CD8+ obtenidos de los bazos de los ratones CD3 $\gamma\delta\epsilon$ humanizados.

Las **FIGS. 6A-B** son una demostración de títulos de LCMV víricos en los bazos tanto de ratones del control de tipo natural como de ratones CD3 $\gamma\delta\epsilon$ humanizados en ratones infectados con el clon 13 de LCMV (**FIG. 6A**), o el clon 13 de LCMV tras la infección anterior por el clon Armstrong de LCMV (**FIG. 6B**).

La **FIG. 7** son los datos del análisis FACS de esplenocitos de ratones de tipo natural (WT), ratones CD3 $\gamma\delta\epsilon$ heterocigóticos humanizados (hCD3 $\gamma\delta\epsilon$ Het), o ratones CD3 $\gamma\delta\epsilon$ homocigóticos humanizados (hCD3 $\gamma\delta\epsilon$ Ho) clasificados con dos anticuerpos dirigidos contra CD3 humana que también reaccionan en cruzado con CD3 de ratón (ah/mfCD3-2 y ah/mfCD3-1), dos anticuerpos dirigidos contra CD3 humana que son específicos de CD3 humana (ahCD3-1 y ahCD3-2), un anticuerpo del control dirigido contra CD3 de ratón (amCD3-2C11), un anticuerpo del control no relacionado con IgG humana (hlgG del control) y un anticuerpo del control solo secundario (2 $^{\circ}$ solo). Los valores del IMF se enumeran en las tablas debajo de cada gráfico.

La **FIG. 8** demuestra la respuesta de los anticuerpos dirigidos contra CD3 en ratones CD3 $\gamma\delta\epsilon$ humanizados. La **FIG. 8A** demuestra el agotamiento de los linfocitos T y B transitorios en la sangre de los ratones tratados con anticuerpos dirigidos contra CD3; tanto el agotamiento de los linfocitos T en el día 1 para cada anticuerpo indicado (figura de la izquierda), como el agotamiento de los linfocitos T y B y la recuperación en aproximadamente 14 días para cada anticuerpo ensayado (figuras intermedia y de la derecha). La **FIG. 8B** representa un aumento en la concentración de citoquinas liberadas (IFN γ , KC, TNF α , IL-6 e IL-10) 2 horas después del tratamiento con los anticuerpos indicados.

La **FIG. 9** demuestra la proliferación de esplenocitos (medido como doble activación sobre las células solo) tras el tratamiento con cantidades crecientes de los anticuerpos indicados en ratones de tipo silvestre (WT) y ratones CD3 $\gamma\delta\epsilon$ homocigóticos humanizados (hCD3 $\gamma\delta\epsilon$ Ho).

La **FIG. 10** es una tabla que resume diversas propiedades del modelo de ratones CD3 humanizados.

La **FIG. 11A** demuestra el efecto de un anticuerpo dirigido contra CD3 (Ab-1; un anticuerpo biespecífico que reconoce CD3 y CD20, ensayado a dos concentraciones diferentes en el volumen tumoral de tumores B16F10.9/CD20 cuando se inició el tratamiento al mismo tiempo como implante tumoral (modelo profiláctico). La **FIG. 11B** demuestra el efecto del anticuerpo dirigido contra CD3 (Ab-1; un anticuerpo biespecífico que reconoce CD3 y CD20, ensayado a dos concentraciones diferentes) sobre el volumen tumoral de tumores B16F10.9/CD20 ya establecidos (modelo terapéutico).

Descripción detallada

Definiciones

La presente invención proporciona ratones genéticamente modificados de acuerdo con la reivindicación 1. Se divulgan en el presente documento ratones genéticamente modificados que comprenden en su genoma, por ejemplo, en su línea germinal, loci CD3 genéticamente modificados que codifican proteínas CD3 humanizadas, por ejemplo, proteínas CD3 quiméricas ser humano/ratón. Se divulgan también embriones, células y tejidos que comprenden los mismos, métodos para preparar los mismos, así como métodos para utilizar los mismos. A menos que se definan de otro modo, todos los términos y expresiones utilizados en el presente documento incluyen los significados que los términos y las expresiones tienen en la técnica, salvo que se indique claramente lo contrario o sea claramente evidente a partir del contexto en el que se usa un término o expresión.

"CD3", como se usa en el presente documento, incluye un antígeno que se expresa en linfocitos T como parte del complejo del receptor de linfocitos T multimolecular (TCR); el complejo TCR multimolecular formado a partir de la asociación de homodímeros y/o heterodímeros que comprende una o más de las siguientes cadenas de receptores: CD3-épsilon (ϵ), CD3-delta (δ), CD3-zeta (ζ) y CD3-gamma (γ) (véase la **FIG. 1**). Las secuencias y los números de registro del GenBank de CD3-delta, CD3-zeta, y CD3-gamma humana y de ratón se presentan en la Tabla 4 siguiente. A lo largo de la solicitud, ϵ o épsilon pueden escribirse también como E, δ o delta pueden escribirse como D,

ζ o zeta pueden también escribirse como Z, y γ o gamma pueden también escribirse como G.

Como se usa en el presente documento, "un anticuerpo que se une a CD3" o un "anticuerpo dirigido contra CD3" incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que reconocen específicamente una subunidad CD3 única (por ejemplo, épsilon, delta, gamma o zeta), así como anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que reconocen específicamente un complejo dimérico de dos subunidades CD3 (por ejemplo, dímeros gamma/épsilon, delta/épsilon y zeta/zeta de CD3). Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la presente invención pueden unirse a CD3 soluble y/o CD3 expresada en la superficie celular. CD3 soluble incluye proteínas CD3 naturales, así como variantes de proteínas CD3 recombinantes como, por ejemplo, construcciones CD3 monoméricas y diméricas, que carecen de un dominio transmembrana o que no están asociadas con una membrana celular.

El término "conservativa", cuando se usa para describir una sustitución conservativa de aminoácidos, incluye la sustitución de un resto de aminoácido por otro resto de aminoácido que tiene un grupo R de la cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). Se pueden conseguir sustituciones aromáticas 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 las proteínas CD3 de jugar un papel en el ensamblaje y la señalización del receptor de los linfocitos T. Ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen cadenas laterales alifáticas tales como glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; cadenas laterales de hidroxilo alifáticas tales como serina y treonina; cadenas secundarias que contienen amida tales como asparagina y glutamina; cadenas secundarias aromáticas tales como fenilalanina, tirosina y triptófano; cadenas laterales básicas tales como lisina, arginina e histidina; cadenas laterales ácidas tales como ácido aspártico y ácido glutámico; y, cadenas laterales que contienen azufre tales como cisteína y metionina. Los grupos de sustituciones de aminoácidos conservativas 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 natural en una proteína con alanina, como se usa en, por ejemplo, mutagénesis por barrido de alanina. En algunas realizaciones, se realiza una sustitución conservativa que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica de PAM250 divulgada en Gonnet *et al.* ((1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256:1443-45).

En algunas realizaciones, la sustitución es una sustitución moderadamente conservativa en donde la sustitución tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica de PAM250.

Por tanto, está abarcado por la invención un ratón genéticamente modificado que expresa proteínas CD3 humanizadas que comprenden sustituciones de aminoácidos conservativas en la secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento.

Un experto en la materia entenderá que en la adición a los restos de ácidos nucleicos que codifican las proteínas CD3 humanizadas descritas en el presente documento, debido a la degeneración del código genético, otros ácidos nucleicos pueden codificar los polipéptidos de la invención. Por lo tanto, además de un ratón genéticamente modificado que comprende en su genoma secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas CD3 humanizadas descritas en el presente documento, se proporciona también un ratón que comprende en su genoma secuencias de nucleótidos que difieren de las descritas en el presente documento debido a la degeneración del código genético.

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

La expresión "unido operativamente" incluye una yuxtaposición en la que los componentes descritos de esta manera están en una relación que les permite funcionar en su manera prevista. Como tal, una secuencia del ácido nucleico que codifica una proteína puede estar unida operativamente a secuencias reguladoras (por ejemplo, un promotor, potenciador, secuencia silenciadora, etc.) con el fin de conservar la regulación de la transcripción adecuada. Además, varias partes de la proteína humanizada de la invención pueden unirse operativamente para retener el adecuado plegado, procesamiento, direccionamiento, expresión y otras propiedades funcionales de la proteína en la célula. Salvo que se indique lo contrario, varios dominios de la proteína humanizada de la invención se unen operativamente entre sí. El enlace operativo de un dominio extracelular humano de una proteína CD3 y los dominios transmembrana y citoplásmico no humanos puede conseguirse mediante la expresión de estos componentes como una proteína de

fusión contigua a partir de una secuencia que codifica un ácido nucleico.

El término "sustitución", en referencia a la sustitución de genes, incluye colocar material genético exógeno en un locus genético endógeno, sustituyendo, por tanto, la totalidad o una porción del gen endógeno con una secuencia del ácido nucleico ortóloga u homóloga. En un caso, un gen no humano endógeno o fragmento del mismo se sustituye con un gen humano correspondiente o el fragmento del mismo. Por ejemplo, el ADN que codifica el dominio extracelular de una proteína CD3 de ratón u otra no humana puede sustituirse por ADN que codifica el dominio extracelular de la proteína A humana correspondiente que corresponde a un gen humano o un fragmento del mismo es un gen humano o fragmento que es un ortólogo de, un homólogo de, o es sustancialmente idéntico o el mismo en estructura y/o función, que el gen no humano endógeno o fragmento del mismo que se sustituye. Como se demuestra en los Ejemplos siguientes, las secuencias de nucleótidos que codifican los dominios extracelulares CD3 no humanos endógenos se sustituyeron por las secuencias de nucleótidos que correspondían a dominios extracelulares de CD3 humanos.

"Funcional" como se usa en el presente documento, por ejemplo, en referencia a una proteína funcional, incluye una proteína que retiene al menos una actividad biológica normalmente asociada con la proteína nativa. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la invención, una sustitución en un locus endógeno (por ejemplo, la sustitución en los loci de CD3 no humanos endógenos) da como resultado un locus que fracasa en expresar un polipéptido endógeno funcional.

El término "locus" como en el locus CD3 incluye el ADN genómico que comprende una región que codifica CD3. Los genes CD3 CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ se cartografiaban próximos entre sí en el mismo cromosoma. Dependiendo por tanto del contexto, la referencia a un locus CD3 endógeno puede referirse a un locus que incluye alguna o todas de estas regiones de codificación o una región de codificación individual. Por ejemplo, si solo una de las CD3 humana, tal como una CD3 ϵ se introduce en un animal no humano, entonces, el ácido nucleico que codifica esta CD3 modifica preferentemente el locus de la CD3 no humana correspondiente. Si algunas CD3 humanas se introducen en un animal no humano tales como CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ , entonces el locus endógeno modificado incluye las regiones de codificación de cada una de las CD3 ϵ , CD3 δ y CD3 γ . Un locus CD3 puede referirse también al locus de CD3 ζ , que ocupa un cromosoma diferente que CD3 ϵ , CD3 δ y CD3 γ . Si CD3 ζ humana se introduce junta con cualquiera de CD3 ϵ , CD3 δ o CD3 γ humanas, entonces, dos o más loci CD3 pueden modificarse en diferentes cromosomas. Se pueden incluir otras secuencias en el locus de CD3 que se han introducido para los fines de manipulación genética, por ejemplo, casetes de selección, sitios de restricción, etc.

El término "línea germinal" en referencia a una secuencia de ácido nucleico de la inmunoglobulina incluye una secuencia de ácido nucleico que se puede pasar a la progenie.

La expresión "molécula de inmunoglobulina" incluye dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina. Las cadenas pesadas pueden ser idénticas o diferentes, y las cadenas ligeras pueden ser idénticas o diferentes.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, incluye moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada dominio y una región constante de cadena pesada (C_H). La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, C_H1, C_H2 y C_H3. Cada cadena ligera comprende un dominio variable de cadena ligera y una región constante de cadena ligera (C_L). Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR). Cada dominio variable de cadena pesada y cadena ligera comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (las CDR de cadena pesada pueden abreviarse como HCDR1, HCDR2 y HCDR3; las CDR de cadena ligera pueden abreviarse como LCDR1, LCDR2 y LCDR3).

La expresión anticuerpo de "alta afinidad" se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D con respecto a su epítipo diana aproximadamente de 10⁻⁹ M o inferior (por ejemplo, aproximadamente 1 x 10⁻⁹ M, 1 x 10⁻¹⁰ M, 1 x 10⁻¹¹ M, o aproximadamente 1 x 10⁻¹² M).

La expresión "anticuerpo biespecífico" incluye un anticuerpo capaz de unir selectivamente dos epítopos). Los anticuerpos biespecíficos comprenden generalmente dos brazos, uniéndose cada uno a un epítipo diferente (por ejemplo, dos cadenas pesadas con diferentes especificidades) tanto en dos moléculas diferentes (por ejemplo, epítopos diferentes en dos inmunógenos diferentes) como en la misma molécula (por ejemplo, epítopos diferentes en el mismo inmunógeno). Si un anticuerpo biespecífico puede unirse selectivamente a dos epítopos diferentes (un primer epítipo y un segundo epítipo), la afinidad del primer brazo de anticuerpo por el primer epítipo será generalmente al menos de uno a dos o de tres a cuatro o más órdenes de magnitud menor que la afinidad del primer brazo de anticuerpo por el segundo epítipo, y viceversa. Los epítopos que se unen específicamente por el anticuerpo biespecífico pueden estar en la misma diana o en una diana diferente (por ejemplo, en la misma o en una proteína diferente). Los anticuerpos biespecíficos ilustrativos incluyen los que tienen un primer brazo de anticuerpo específico para un antígeno tumoral y un segundo brazo de anticuerpo específico para un marcador citotóxico, por ejemplo, un receptor Fc (por

ejemplo, FcγRI, FcγRII, FcγRIII, etc.) o un marcador de linfocitos T (por ejemplo, CD3, CD28, etc.). En una realización de la presente invención, un brazo del anticuerpo biespecífico es específico de CD3. Además, un anticuerpo biespecífico con un primer brazo específico para un antígeno tumoral y un segundo brazo específico para una toxina pueden emparejarse de manera que liberen una toxina (por ejemplo, saporina, alcaloide de la vinca, etc.) a una célula tumoral. Otros anticuerpos biespecíficos ilustrativos incluyen aquellos con un primer brazo específico para un receptor de la activación (por ejemplo, receptores de los linfocitos B, FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, FcγRI, receptores de linfocitos T, etc.) y un segundo brazo específico para un receptor inhibitorio (por ejemplo, FcγRIIB, CD5, CD22, CD72, CD300a, etc.). Dichos anticuerpos biespecíficos pueden construirse para dolencias terapéuticas asociadas con la activación celular (por ejemplo, alergia y asma). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse, por ejemplo, combinando cadenas pesadas que reconocen diferentes epítomos del mismo inmunógeno. Por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos que codifican secuencias variables de cadena pesada que reconocen diferentes epítomos del mismo inmunógeno se pueden fusionar a secuencias de ácidos nucleicos que codifican la misma o diferentes regiones constantes de cadena pesada, y dichas secuencias se pueden expresar en una célula que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina. Un anticuerpo biespecífico típico tiene dos cadenas pesadas que tienen cada una tres cadenas CDR pesadas, seguido por un dominio C_H1 (extremo N a extremo C), una bisagra, un dominio C_H2, y un dominio C_H3, y una cadena ligera de inmunoglobulina que no confiere especificidad de unión a epítopo pero que puede asociarse con cada cadena pesada, o que puede asociarse con cada cadena pesada y que puede unirse a uno o más epítomos, por las regiones de unión a epítopo de la cadena pesada, o que pueden asociarse con cada cadena pesada y permitir la unión de uno o ambas de las cadenas pesadas a uno o ambos epítomos. De manera similar, la expresión "anticuerpo multiespecífico" incluye un anticuerpo que puede unir selectivamente múltiples epítomos (por ejemplo, dos, tres, cuatro epítomos).

La expresión "región determinante de complementariedad", o el término "CDR", incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico de los genes de la inmunoglobulina de un organismo que normalmente (es decir, en un animal de tipo silvestre) aparecen entre dos regiones marco en una región variable de una cadena ligera o una cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina. Una CDR puede estar codificada por, por ejemplo, una secuencia de una línea germinal o una reordenada o no reordenada, y, por ejemplo, por un linfocito B no expuesto anteriormente o un linfocito B maduro. Una CDR puede estar mutada somáticamente (por ejemplo, variar a partir de una secuencia codificada en una línea germinal de mamífero), humanizada, y/ modificada con sustituciones, adiciones, o deleciones de aminoácidos. En algunas circunstancias (por ejemplo, para una CDR3), Las CDR pueden estar codificadas por dos o más secuencias (por ejemplo, secuencias de la línea germinal) que no son contiguas (por ejemplo, en una secuencia de ácido nucleico no ordenada) pero son contiguas en una secuencia de ácido nucleico de un linfocito B, por ejemplo, como resultado del corte y empalme o de conectar las secuencias (por ejemplo, recombinación V-D-J para formar una cadena pesada CDR3).

La expresión "fragmento funcional" incluye fragmentos de proteínas de unión a antígeno tales como anticuerpos que se pueden expresar, secretar, y unirse específicamente a un epítopo con una K_D en el intervalo micromolar, nanomolar, o picomolar. El reconocimiento específico incluye tener una K_D que está al menos en el intervalo micromolar, el intervalo nanomolar, o el intervalo picomolar.

la expresión "cadena pesada", o "inmunoglobulina de cadena pesada" incluye una secuencia de cadena pesada de la inmunoglobulina, incluyendo la secuencia de región constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, procedente de cualquier organismo. Los dominios variables de cadena pesada incluyen tres cadenas CDR pesadas y cuatro regiones FR, a menos que se especifique de otra manera. Los fragmentos de cadenas pesadas incluyen CDR, CDR y FR, y combinaciones de las mismas. Una cadena pesada típica tiene, siguiendo el dominio variable (desde el extremo N al extremo C), un dominio C_H1, una bisagra, un dominio C_H2 y un dominio C_H3. Un fragmento funcional de una cadena pesada incluye un fragmento que es capaz de reconocer específicamente un epítopo (por ejemplo, reconocer el epítopo con una K_D en el intervalo micromolar, nanomolar, o picomolar), que es capaz de expresar y secretar a partir de una célula, y que comprende al menos una CDR. Un dominio variable de cadena pesada está codificado por una secuencia génica de región variable, que comprende generalmente segmentos de V_H, D_H, y J_H derivados de un repertorio de segmentos V_H, D_H, y J_H presentes en la línea germinal. Las secuencias, localizaciones y nomenclatura para los segmentos de cadenas pesadas V D, y J para diversos organismos se pueden encontrar en el sitio web para el International Immunogenetics Information System (base de datos IMGT).

La expresión "cadena ligera" incluye una secuencia de cadena ligera de inmunoglobulina de cualquier organismo, y a menos que se especifique de otra manera incluye las cadenas ligeras kappa y lambda y VpreB, así como cadenas ligeras surrogadas. Los dominios variables de cadenas ligeras incluyen normalmente tres regiones CDR de cadenas ligeras y cuatro regiones marco (FR), a menos que se especifique de otra manera. En general, una cadena ligera de longitud completa incluye, desde el extremo amino al extremo carboxilo, un dominio variable que incluye FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, y una región constante de cadena ligera. Un dominio variable de cadena ligera está codificado por una secuencia génica de región variable de cadena ligera, que comprende generalmente segmentos de V_L y J_L, derivados de un repertorio de segmentos V y J presentes en la línea germinal. Las secuencias, localizaciones y nomenclatura de los segmentos de cadena ligera V y J para diversos organismos se pueden encontrar en el sitio web del International Immunogenetics Information System (base de datos IMGT). Las cadenas ligeras incluyen aquellas, por ejemplo, que no se unen selectivamente a ningún epítopo reconocido por la proteína de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos) en la que aparecen. Las cadenas ligeras incluyen también aquellas que se unen

y reconocen, o ayudan a la cadena pesada con la unión y el reconocimiento, uno o más epítomos se unen selectivamente por la proteína de unión a antígeno (por ejemplo, un anticuerpo) en la que aparecen.

La expresión "proteína de unión a antígeno" como se usa en el presente documento incluye anticuerpos y diversas moléculas de origen natural y diseñadas capaces de unirse al antígeno de interés. Las mencionadas incluyen, por ejemplo, anticuerpos específicos de dominio, anticuerpos de dominio único (derivados, por ejemplo, de camélidos y peces, etc.), anticuerpos de dominio suprimido, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (por ejemplo, nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), compuestos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP), dominios IgNAR variables de tiburón, etc. La proteína de unión a antígeno puede incluir también fragmentos de unión a antígeno tales como, por ejemplo, (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')₂; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas Fv monocatenarias (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimo que consisten en los restos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, tal como un péptido CDR3), etc.

El término "célula" incluye cualquier célula que sea adecuada para expresar una secuencia de ácido nucleico recombinante. Las células incluyen las de procariotas y eucariotas (unicelulares o pluricelulares), células bacterianas (p. ej., cepas de *E. coli*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., etc.), células de micobacterias, células fúngicas, células de levaduras (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolica*, etc.), células vegetales, células de insectos (p. ej., SF-9, SF-21, células de insectos infectadas por baculovirus, *Trichoplusia ni*, etc.), células animales no humanas, células humanas, o fusiones de células tal como, por ejemplo, hibridomas o cuadromas. En algunas realizaciones, la célula es una célula humana, de mono, de simio, de hámster, de rata o de ratón. En algunas realizaciones, la célula es eucariota y se selecciona entre las siguientes células: CHO (p. ej., CHO K1, CHO DXB-11, Veggie-CHO), COS (p. ej., COS-7), célula de la retina, Vero, CV1, de riñón (p. ej., HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (p. ej., BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, célula de Sertoli, célula BRL 3A, célula HT1080, célula de mieloma, célula tumoral y una línea celular derivada de una célula mencionada anteriormente. En algunas realizaciones, la célula comprende uno o más genes víricos, una célula de la retina que expresa un gen vírico (p. ej., una célula PER.C6™). En algunas realizaciones, la célula es una célula ES.

Una proteína CD3 humanizada significa una proteína CD3 en la que, en una realización, un dominio extracelular es de una secuencia humana. Los dominios transmembrana y citoplásmico pueden ser también humanos, pero son preferentemente secuencias endógenas no humanas. Una proteína CD3 incluye secuencias de diferentes especies, particularmente un dominio extracelular humano, y dominios transmembrana y citoplásmicos no humanos, puede denominarse también como una proteína CD3 quimérica.

Animales CD3 humanizados genéticamente modificados

En el presente documento se desvelan animales no humanos genéticamente modificados (por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratones o ratas) que comprenden en su genoma (por ejemplo, en el genoma de su línea germinal) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CD3 humanizada (por ejemplo, una CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ humanizadas, o una combinación de las mismas). la presente invención proporciona ratones genéticamente modificados que comprenden en su genoma secuencias de nucleótidos que codifican proteínas CD3 δ humanizadas, proteínas CD3 γ humanizadas y proteínas CD3 ϵ humanizadas. Por tanto, en algunas realizaciones de la invención, el ratón expresa un complejo CD3 $\gamma\delta\epsilon$ humanizado sobre la superficie de sus linfocitos T de tal manera que el CD3 $\gamma\delta\epsilon$ humanizado forma un complejo con el receptor de linfocitos T expresado sobre el mismo linfocito T.

la molécula CD3 es comúnmente una diana de agentes que tienen como objetivo modelar la inmunidad de los linfocitos T, y se han desarrollado para este fin algunos anticuerpos dirigidos contra CD3 (por ejemplo, muromonab-CD3 u OKT3). Los anticuerpos dirigidos contra CD3 tales como OKT3 se usan como agentes inmunosupresores (por ejemplo, en el rechazo al trasplante) pero se estudian también por su potencial terapéutico en enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, en la enfermedad de Crohn, diabetes de tipo I, colitis ulcerosa, etc.).

Adicionalmente, Se estudiaron también las moléculas CD3 como dianas para agentes biespecíficos, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, debido a la capacidad de los anticuerpos biespecíficos contra CD3 de reclutar linfocitos T para una célula diana, por ejemplo, una célula que expresa un antígeno concreto de interés. Se describen anticuerpos biespecíficos dirigidos contra CD3 ilustrativos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2014/0088295, y en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2015/0266966.

Durante la etapa de desarrollo del fármaco preclínica, los agentes candidatos se estudian normalmente basándose en su eficacia, toxicidad, y otras propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. Los agentes candidatos, tales como anticuerpos, se dirigen normalmente a un antígeno humano --ya que la meta final de la investigación es desarrollar una terapia humana. Se llevaron a cabo muchos estudios preclínicos en animales grandes tales como primates ya que su fisiología y el metabolismo del fármaco son los más similares a los seres humanos. Se conocen varios anticuerpos desarrollados para CD3 (por ejemplo, OKT3) que no reaccionan en cruzado con una CD3 no humana, particularmente con una CD3 de primate. Para llevar a cabo investigaciones preclínicas eficaces que se refieran a la eficacia, toxicidad,

y otros parámetros de un fármaco candidato, en primer lugar, el fármaco candidato debe determinarse para reconocer la molécula CD3 de primate.

5 Sin embargo, un factor separado que complica el desarrollo de una terapia dirigida contra CD3 es que los grandes primates tales como chimpancés están en peligro y en muchos países se prohíben los chimpancés; aunque los estudios en otros primates, por ejemplo, los macacos (*Macaca fascicularis*), puede plantear preocupaciones éticas. Por ejemplo, Por todos los motivos anteriores, hasta la fecha el modelo de primate no es eficaz en tumores humanos. Por tanto, cualquier dato preliminar sobre un candidato terapéutico específico que se puede obtener en un modelo animal más pequeño, tal como un roedor, por ejemplo, un ratón, puede ser útil en determinar un progreso adicional de investigaciones preclínicas en grandes primates.

15 Los estudios preclínicos en modelos animales pequeños, tales como ratones, se han llevado a cabo tradicionalmente usando fármacos surrogados. Por ejemplo, cuando un candidato clínico que se dirige a un antígeno humano específico está en desarrollo, se generan algunos datos preclínicos en un ratón utilizando una molécula, por ejemplo, una proteína de unión a antígeno o un anticuerpo, que se dirige específicamente a un homólogo de ratón del antígeno de interés. La información acerca de la eficacia, diversos regímenes de dosificación, la toxicidad y los efectos secundarios, y otros aspectos de la administración de fármacos se recaban a partir de dichos estudios de fármacos surrogados. Sin embargo, dichos hallazgos están limitados debido a que no es el fármaco real el que está en desarrollo o su diana humana la que se está estudiando.

20 Por tanto, el modelo animal pequeño más útil para llevar a cabo estudios preclínicos preliminares es un animal no humano, por ejemplo, un roedor, que expresa una proteína CD3 humana o humanizada, y permite el ensayo de fármacos candidatos dirigidos contra CD3 que también reacciona en cruzado con el macaco CD3, permitiendo estudios preclínicos de primates posteriores. La presente invención proporciona dicho modelo de ratón intrincado.

25 Por tanto, Se proporciona en el presente documento un animal no humano genéticamente modificado que comprende en su genoma una(s) secuencia(s) de ácido(s) nucleico(s) que codifica un dominio extracelular de una proteína CD3 humana. En algunos ejemplos, la proteína CD3 se selecciona entre el grupo que consiste en CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD3 ζ , y una combinación de las mismas. En algunos ejemplos, la proteína CD3 se selecciona entre el grupo que consiste en CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , y una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la proteína CD3 comprende las cadenas polipeptídicas CD3 γ , CD3 δ , y CD3 ϵ . Por tanto, el ratón genéticamente modificado comprende en su genoma de una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican un dominio extracelular de una CD3 γ humana, un dominio extracelular de una CD3 δ humana, y un dominio extracelular de una CD3 ϵ humana. En algunas de dichas realizaciones, los dominios extracelulares de CD3 γ , CD3 δ , y CD3 ϵ puede estar codificado por un único ácido nucleico. En algunas realizaciones, los dominios extracelulares de CD3 γ , CD3 δ , y CD3 ϵ humanas están codificados por ácidos nucleicos separados.

35 En algunas realizaciones, el ratón descrito en el presente documento retiene promotores de CD3 no humanos endógenos y/o elementos reguladores (por ejemplo, promotores CD3 γ , CD3 δ , y/o CD3 ϵ y/o elementos reguladores). En otras realizaciones, el ratón comprende promotores de CD3 humanos y elementos reguladores.

40 Aunque se ha postulado que la mayoría de anticuerpos generados contra CD3 reconoce epítomos CD3 ϵ (véase, Tunnacliffe *et al.* (1989) *International Immunology*, 1(5):546-50), existen numerosos agentes que pueden reconocer otras subunidades CD3 (e.g., CD3 γ o CD3 δ) o requiere el ensamblaje del complejo CD3 para la unión. Por tanto, el ratón genéticamente modificado comprende en su genoma una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican un dominio extracelular de una CD3 γ humana, un dominio extracelular de una CD3 δ humana, y un dominio extracelular de una CD3 ϵ humana, proporciona una ventaja ya que puede acomodar un agente que uniría cualquiera de las subunidades CD3 o el complejo CD3.

50 Se presentan proteínas CD3 ilustrativas en el alineamiento en la FIG. 4. Se puede encontrar una secuencia de proteína CD3 ϵ de ratón en el número de registro del GenBank NP_031674 y la SEQ ID NO: 27, aunque se puede encontrar una secuencia de proteína CD3 ϵ humana en el número de registro GenBank NP_000724 y la SEQ ID NO: 28. Se puede encontrar una secuencia de proteína CD3 δ de ratón en el número de registro del GenBank NP_038515 y la SEQ ID NO: 29, aunque se puede encontrar una secuencia de proteína CD δ humana en el número de registro del GenBank NP_000723 y la SEQ ID NO: 30. Se puede encontrar una secuencia de proteína CD3 γ de ratón en el número de registro del GenBank NP_033980 y la SEQ ID NO: 31, aunque se puede encontrar una secuencia de proteína CD3 γ humana en el número de registro GenBank NP_000064 y la SEQ ID NO: 32.

60 En la invención, la(s) secuencia(s) de ácidos nucleicos que codifican un dominio extracelular de una CD3 humana, por ejemplo, un dominio extracelular de una CD3 γ humana, una CD3 δ humana, y una CD3 ϵ humana, están localizadas en un locus CD3 endógeno de ratón. En otras palabras, dicho ácido nucleico modifica el locus CD3 endógeno para codificar el polipéptido CD3 humano. En algunas realizaciones de la invención, el ratón no comprende un dominio extracelular funcional de la proteína CD3 de ratón correspondiente debido a que la modificación genética del locus endógeno de tal manera que no se exprese el dominio extracelular funcional. En algunas realizaciones de la invención, la(s) secuencia(s) de ácido(s) nucleico(s) que codifica un dominio extracelular de una CD3 humana sustituye las secuencia(s) de ácido(s) nucleico(s) correspondientes que codifican la CD3 de un ratón endógeno. Por tanto, en

algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio extracelular de CD3 γ humana sustituye la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio extracelular de CD3 γ endógena de ratón, la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio extracelular de una CD3 δ humana sustituye la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio extracelular de CD3 δ endógena de ratón y la secuencia que codifica el dominio extracelular de una CD3 ϵ humana sustituye la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio extracelular de CD3 ϵ endógena de ratón. En algunas realizaciones, la sustitución no comprende la sustitución de una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de señalización endógena. En otra realización, la sustitución comprende la sustitución de una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de señalización endógena con la secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de señalización humana.

En algunos aspectos de la invención, el dominio extracelular comprende la región de la(s) proteína(s) que no es un dominio transmembrana o un dominio citoplásmico, por ejemplo, la región de la proteína que aparece sobre la superficie de la célula y que, en parte, cuando se ensambla en un complejo interactúa con los dominios extracelulares de otros componentes del complejo de señalización de TCR, por ejemplo, los dominios extracelulares TCR alfa y beta. En diversas realizaciones descritas en el presente documento, el dominio extracelular se refiere al dominio de la proteína expresado sobre la superficie celular y, a menos que se indique lo contrario, no incluye la secuencia de señalización que se escinde proteolíticamente normalmente antes de agotar la expresión superficial. En algunas realizaciones de la invención, el dominio extracelular de CD3 ϵ comprende los aminoácidos 17-130 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 24 (se muestra por separado como SEQ ID NO: 33). En algunas de dichas realizaciones, el animal comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de señalización de CD3 ϵ endógena, por ejemplo, la secuencia de señalización en los aminoácidos 1-16 de la SEQ ID NO: 24. En otras realizaciones de la invención, el animal comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de señalización de CD3 ϵ humana. En algunas realizaciones de la invención, el dominio extracelular de CD3 δ comprende los aminoácidos 19-105 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 25 (se muestra por separado como SEQ ID NO: 34). En algunas de dichas realizaciones, el ratón comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de señalización de CD3 δ endógena, por ejemplo, la secuencia de señalización en los aminoácidos 1-18 de la SEQ ID NO: 25. En otras realizaciones de la invención, el ratón comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de señalización de la CD3 δ humana. En algunas realizaciones, el dominio extracelular de CD3 γ comprende los aminoácidos 20-116 de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 26 (se muestra por separado como SEQ ID NO: 35). En algunas de dichas realizaciones, el ratón comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de señalización de CD3 γ endógena, por ejemplo, la secuencia de señalización en los aminoácidos 1-19 de la SEQ ID NO: 26. En otras realizaciones de la invención, el ratón comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de señalización de la CD3 γ humana.

En algunos aspectos de la invención, el ratón comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica los dominios transmembrana y citoplásmico de la proteína CD3 endógena, por ejemplo, la proteína CD3 endógena correspondiente. Por tanto, en una realización, el ratón comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio extracelular de la proteína CD3 humana unida operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica los dominios transmembrana y citoplásmico de la proteína CD3 endógena de ratón correspondiente de tal manera que la proteína quimérica que comprende el dominio extracelular de la proteína CD3 humana y se expresan los dominios transmembrana y citoplásmico de la proteína CD3 endógena de ratón correspondiente. Por tanto, en un aspecto, el animal comprende en un locus CD3 endógeno una(s) secuencia(s) de ácidos nucleicos que codifica un dominio extracelular de una proteína CD3 humana unida operativamente a una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican los dominios transmembrana y citoplásmico de CD3 endógena de ratón. En una realización, el ratón comprende en un locus CD3 ϵ endógeno de ratón una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de una CD3 ϵ humana unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica los dominios transmembrana y citoplásmico de una CD3 ϵ endógena de ratón, en un locus CD3 δ endógeno una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de una CD3 δ humana unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica los dominios transmembrana y citoplásmico de una CD3 δ endógena de ratón, y en un locus CD3 γ endógeno una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de una CD3 γ humana unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica los dominios transmembrana y citoplásmico de una CD3 γ endógena de ratón. El uso de proteínas CD3 quiméricas con un dominio extracelular humano y dominios transmembrana y citoplásmico endógenos permite la interacción de fármacos con especificidad por la CD3 humana pero puede permitir también recapitular la interacción con el receptor de linfocitos T endógeno y sus componentes de transducción de la señal en comparación con una proteína CD3 completamente humana.

El ratón expresa dominios extracelulares de la proteína CD3 humana. En algunos aspectos, el ratón expresa un dominio extracelular de CD3 ϵ humana que se muestra en la SEQ ID NO: 33. En algunos aspectos, el ratón expresa un dominio extracelular de CD3 δ humana que se muestra en la SEQ ID NO: 34. En algunos aspectos, el ratón expresa un dominio extracelular de CD3 γ humana que se muestra en la SEQ ID NO: 35.

El animal no humano es un ratón.

En una realización, el ratón es de una cepa C57BL seleccionada entre C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/Ka-LwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr y C57BL/Ola. En otra realización, el ratón es una variedad 129 seleccionada entre el grupo que consiste en una variedad que es 129P1,

129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (por ejemplo, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (véase, por ejemplo, Festing *et al.* (1999) Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome 10:836, véase también, Auerbach *et al.* (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv-and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines). En una realización específica, el ratón genéticamente modificado es una mezcla de una cepa 129 anteriormente mencionada y una cepa C57BL/6 anteriormente mencionada. En otra realización específica, el ratón es una mezcla de las cepas 129 anteriormente mencionadas, o una mezcla de las cepas BL/6 anteriormente mencionadas. En una realización específica, la cepa 129 de la mezcla es una cepa 129S6 (129/SvEvTac). En otra realización, el ratón es una cepa BALB, por ejemplo, cepa BALB/c. En otra realización más, el ratón es una mezcla de una cepa BALB y otra cepa anteriormente mencionada.

El animal no humano es un ratón. Por tanto, el animal genéticamente modificado es un ratón que comprende en un locus CD3 endógeno de ratón una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de una proteína CD3 humana. El ratón comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio extracelular de una CD3ε humana, una secuencia de ácido nucleico de un dominio extracelular de una CD3δ humana y una secuencia de ácido nucleico de un dominio extracelular de un CD3γ humana. En algunas realizaciones de la invención, el dominio extracelular de la CD3ε humana comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 33, el dominio extracelular de la CD3δ humana comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 34, y el dominio extracelular de la CD3γ humana comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 35. En algunas realizaciones, el ratón comprende la(s) secuencia(s) que codifican la(s) secuencia(s) de señalización de CD3 endógeno de ratón. En otras realizaciones, el ratón comprende la(s) secuencia(s) que codifica(n) la(s) secuencia(s) de señalización de CD3 humanas.

El ratón de la invención expresa la(s) proteína(s) CD3 humanizadas. El ratón expresa las proteínas CD3ε humanizadas, proteínas CD3δ humanizadas y proteínas CD3γ humanizadas. En algunas realizaciones de la invención, el ratón expresa un dominio extracelular de CD3ε humana y los dominios transmembrana y citoplásmico de CD3ε endógena de ratón, un dominio extracelular de CD3δ humana y los dominios transmembrana y citoplásmico de CD3δ endógena de ratón, y un dominio extracelular de CD3γ humana y los dominios transmembrana y citoplásmico de CD3γ endógena de ratón. En algunas de dichas realizaciones, el ratón expresa proteínas CD3 humanizadas en donde las proteínas CD3 humanizadas son las CD3ε humanizadas que se muestran en la SEQ ID NO: 24, las CD3δ humanizadas que se muestran en la SEQ ID NO: 25 y la CD3γ humanizada que se muestra en la SEQ ID NO: 26.

En algunos aspectos de la invención, el ratón genéticamente modificado es un ratón inmunocompetente. En algunas realizaciones de la invención, la introducción de proteína(s) CD3 no afecta la función del sistema inmunitario del ratón. En algunas realizaciones de la invención, el ratón comprende una relación de linfocitos T y B normal. En algunas realizaciones de la invención, el ratón es capaz de montar una respuesta inmunitaria a la infección del ratón. En algunos aspectos, el ratón muestra una relación celular CD4+ a CD8+ similar en el timo en comparación con un ratón de tipo silvestre, por ejemplo, un ratón que no se ha modificado genéticamente para expresar proteína(s) CD3 humanizada(s). En algunas realizaciones de la invención, la relación celular CD4+ a CD8+ en el timo que está dentro del 30 %, por ejemplo, dentro del 20 %, por ejemplo, dentro del 15 %, por ejemplo, dentro del 12 %, por ejemplo, dentro del 10 %, por ejemplo, dentro del 5 %, por ejemplo, dentro del 2 %, de la relación celular CD4+ a CD8+ de un ratón que no está genéticamente modificado para expresar proteína(s) CD3. En algunos aspectos, el ratón muestra porcentajes de linfocitos T y B similares en el bazo, los ganglios linfáticos, y la sangre periférica como un ratón de tipo silvestre, por ejemplo, un ratón que no está genéticamente modificado para expresar proteína(s) CD3 humanizadas. En algunos aspectos, el ratón muestra cantidades similares en circulación de glóbulos blancos, linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos como un ratón de tipo silvestre, por ejemplo, un ratón que no está genéticamente modificado para expresar proteína(s) CD3 humanizadas.

También se proporcionan en el presente documento métodos para producir ratones genéticamente modificados descritos en el presente documento. En algunos ejemplos, el método de preparar un ratón genéticamente modificado en donde el animal expresa una proteína CD3 humanizada comprende introducir en el locus CD3 endógeno de un animal no humano una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de una proteína CD3 humana, en donde la proteína CD3 humana se selecciona del grupo que consiste en CD3ε, CD3δ, CD3γ, CD3ζ, y una combinación de las mismas. Si se introducen múltiples proteínas CD3 humanas, se pueden introducir juntas en un único ácido nucleico (como en los Ejemplos presentes) o por separado. Si es de esta última forma, una única línea de células (por ejemplo, la línea de células ES) puede experimentar sucesivas modificaciones hasta que las modificadas incluyan los ácidos nucleicos que codifican las CD3 humanas deseadas. En una realización, el animal no comprende un dominio extracelular funcional de la(s) proteína(s) CD3 no humanas correspondientes. El ratón comprende en un locus CD3 endógeno de ratón una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de CD3ε humana, un dominio extracelular de CD3δ humana y un dominio extracelular de CD3γ humana. En algunas realizaciones, el dominio extracelular de una CD3ε humana se muestra en la SEQ ID NO: 33, el dominio extracelular de una CD3δ humana se muestra en la SEQ ID NO: 34, y el dominio extracelular de una CD3γ humana se muestra en la SEQ ID NO: 35. En una realización, el animal no comprende un dominio extracelular funcional de la(s) proteína(s) CD3 no humanas correspondientes.

En algunas realizaciones, el método de preparar un ratón genéticamente modificado comprende sustituir en el locus CD3 endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio extracelular de una(s) proteína(s) CD3 de ratón

con una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de una(s) proteína(s) CD3 humana(s) correspondiente(s). En una realización, el animal retiene los dominios transmembrana y citoplásmico de la(s) proteína(s) CD3 de ratón. En algunas realizaciones, la sustitución da como resultado una(s) proteína(s) quimérica(s) que comprende un dominio extracelular de una(s) proteína(s) CD3 humanas y los dominios transmembrana y citoplásmico de la(s) proteína(s) CD3 endógena(s) de ratón correspondiente(s).

El(los) ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) la(s) proteína(s) CD3 humana(s) se introducen normalmente en una célula, y un ratón se propaga a partir de la célula. En algunas realizaciones, el método de sustitución utiliza una construcción de direccionamiento preparada utilizando la tecnología VELOCIGENE®, introduciendo la construcción en células ES, e introduciendo los clones de células ES dirigidos en un embrión de ratón utilizando la tecnología VELOCIMOUSE®, como se describe en los Ejemplos.

En una realización, en donde el método comprende la sustitución de la secuencia de nucleótido que codifica el dominio extracelular de una CD3ε endógena de ratón con la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio extracelular de una proteína CD3ε humana, el método comprende una sustitución de la secuencia parcial de los exones 2 a 4 que codifican el gen CD3ε endógeno de ratón con la secuencia parcial de los exones 2 a 5 que codifican el gen CD3ε humano. En una realización, en donde el método comprende la sustitución de la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio extracelular de CD3δ endógena de ratón con la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio extracelular de una CD3δ humana, el método comprende una sustitución de la secuencia parcial de los exones 2 a 3 que codifican CD3δ de ratón con la secuencia parcial de los exones 2 a 3 que codifican el gen CD3δ humano. En una realización, en donde el método comprende una sustitución de la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio extracelular de la CD3γ endógena de ratón con la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio extracelular de la CD3γ humana, el método comprende la sustitución de la secuencia parcial de los exones 2 a 4 que codifican la CD3γ de ratón con la secuencia parcial de los exones 2 a 4 que codifican el gen CD3γ humano. En una realización de la invención, la sustitución comprende la sustitución de la secuencia de CD3ε, CD3δ y CD3γ. En dicha realización, la sustitución puede llevarse a cabo creando un vector de direccionamiento grande que incorpora la modificación genética secuencias en los tres loci y a continuación la introducción del vector de direccionamiento grande en las células ES de ratón para generar un ratón, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 1.

Por tanto, se divulga en el presente documento un vector de direccionamiento grande para generar un animal genéticamente modificado de la invención. En un ejemplo, el vector de direccionamiento grande comprende brazos de homología en 5' y 3' de ratón; un fragmento de ADN que comprende el gen CD3ε que comprende una sustitución de la secuencia parcial de los exones 2 a 4 que codifican CD3ε de ratón por la secuencia parcial de los exones 2 a 5 que codifican CD3ε humana; un fragmento de ADN que comprende el gen CD3δ que comprende una sustitución de la secuencia parcial de los exones 2 a 3 que codifican CD3δ de ratón por la secuencia parcial de los exones 2 a 3 que codifican CD3δ humana; un fragmento de ADN que comprende el gen CD3γ que comprende una sustitución de la secuencia parcial de los exones 2 a 4 que codifican CD3γ de ratón por la secuencia parcial de los exones 2 a 4 que codifican CD3γ humana; y un casete de selección.

Un casete de selección es una secuencia de nucleótidos insertada en una construcción de direccionamiento para facilitar la selección de células (por ejemplo, células bacterianas, células ES) que han integrado la construcción de interés. Se conocen en la técnica numerosos casetes de selección adecuados (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 recombinasas. Los sitios de recombinación comúnmente utilizados son *loxP* y *Frt*, reconocidos por las enzimas Cre y Flp, respectivamente, pero se conocen otros en la técnica. Un casete de selección puede localizarse en cualquier lugar de la construcción fuera de la región codificante de. En un ejemplo, el casete de selección se inserta en la dirección de la secuencia insertada en CD3ε humana.

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

Los heterocigotos resultantes de los métodos anteriores se pueden reproducir para generar homocigotos.

Se divulga un método para producir una molécula CD3 quimérica humana/no humana, que comprende expresar en una única célula una proteína CD3 quimérica de una construcción de nucleótidos como se describe en el presente documento. En un ejemplo, la construcción de nucleótidos es un vector vírico; en un ejemplo específico, el vector vírico

es un vector lentivírico. En un ejemplo, la célula se selecciona entre una CHO, COS, 293, HeLa, y una célula de la retina que expresa una secuencia de ácido nucleico vírica (por ejemplo, una célula PERC.6™).

5 Se divulga una célula que expresa una proteína CD3 humana/no humana quimérica. En un ejemplo, la célula comprende un vector de expresión que comprende una secuencia CCD3 quimérica como se describe en el presente documento. En un ejemplo, la célula se selecciona entre CHO, COS, 293, HeLa, y una célula de la retina que expresa una secuencia de ácido nucleico vírica (por ejemplo, una célula PERC.6™).

10 Se divulga también una molécula CD3 quimérica generada por un ratón como se describe en el presente documento, en donde, en un ejemplo, la molécula CD3 quimérica comprende una secuencia de aminoácidos de todo o sustancialmente todo un dominio extracelular de una proteína CD3 humana, y al menos dominios transmembrana y citoplásmico procedentes de una proteína CD3 no humana, por ejemplo, una proteína CD3 de ratón.

15 Además de un ratón diseñado mediante ingeniería genética para un embrión no humano (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un embrión de ratón o rata) como se divulga también, en donde el embrión comprende una célula ES donante que se deriva de un animal no humano (por ejemplo, un ejemplo, roedor, por ejemplo, un ratón o una rata) como se describe en el presente documento. En un ejemplo, el embrión comprende una célula donante ES que comprende el gen CD3 quimérico y las células embrionarias del hospedador.

20 también se divulga un tejido, en donde el tejido se deriva de un animal no humano (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata) como se describe en el presente documento, y expresa la proteína CD3 quimérica.

25 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 un linfocito T. En un ejemplo, la célula es un linfocito T CD8+. En otro ejemplo, la célula es un linfocito T CD4+.

En algunos ejemplos, se divulgan también en el presente documento loci genéticos que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la(s) proteína(s) CD3 humanizadas descritas en el presente documento.

30 **Modelo de ratón para ensayar terapias humanas**

En algunos aspectos, se proporciona en el presente documento un modelo de ratón para ensayar agentes terapéuticos dirigidos a CD3 ("dirigidos contra CD3") de acuerdo con la reivindicación 8. En algunas realizaciones, se proporciona en el presente documento un modelo de ratón para ensayar proteínas de unión a antígeno dirigidas contra CD3. En algunas realizaciones, se proporciona en el presente documento un modelo de ratón para ensayar anticuerpos dirigidos contra CD3. En algunas de dichas realizaciones, se proporciona un modelo de ratón para ensayar anticuerpos multispecíficos dirigidos contra CD3, por ejemplo, proteínas de unión a antígeno biespecíficas o anticuerpos biespecíficos dirigidos contra CD3. Como tal, una proteína de unión a antígeno multispecífica dirigida contra CD3, por ejemplo, una proteína de unión a antígeno biespecífica dirigida contra CD3, se dirige o se une específicamente a dicha proteína CD3 humanizada y al menos un antígeno diferente de interés. En diversos aspectos, el modelo de ratón para ensayar proteínas de unión a antígeno biespecíficas dirigidas contra CD3 en donde la proteína de unión a antígeno tiene capacidad de unión a ambos CD3 y el antígeno de interés comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CD3 humanizada, en donde la proteína CD3 humanizada comprende CD3ε, CD3δ, CD3γ, y una combinación de las mismas, y una célula que expresa o comprende el antígeno de interés. El ratón comprende un linfocito T que expresa dicha(s) proteína(s) CD3 humanizadas.

En una realización, el ensayo de la proteína de unión a antígeno monoespecífica o biespecífica implica llevar a cabo un ensayo o un estudio que permita la determinación del efecto de la proteína de unión a antígeno sobre el linfocito T que expresa dicha proteína CD3 humanizada. En otra realización, el ensayo de la proteína de unión a antígeno biespecífica implica llevar a cabo un ensayo o estudio que permite la determinación del efecto de la proteína de unión a antígeno en ambos linfocitos T que expresan dicha proteína CD3 humanizada y la célula que expresa o comprende el antígeno de interés, o la interacción entre dicho linfocito T que expresa CD3 y la célula que expresa o comprende el antígeno de interés. En una realización, el ensayo de la proteína de unión a antígeno monoespecífica o biespecífica implica llevar a cabo un ensayo o estudio que permita la determinación del efecto de los linfocitos T que expresan dicha proteína CD3 humanizada sobre la célula que expresa o comprende dicho antígeno de interés. En una realización, dichas medidas de ensayo, por ejemplo, el número de células que expresan el antígeno de interés, respuesta inmunitaria, interacciones celulares, citotoxicidad celular, liberación de citoquinas, activación celular, proliferación celular, crecimiento o regresión tumoral, cambios en la patología, o similares. Diversos ensayos incluyen, aunque no de forma limitativa las mediciones de la citotoxicidad dirigida al complemento (CDC), citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP), proliferación de PBMC, activación de CD69, análisis histológico del tejido, análisis del tejido y de los biomarcadores celulares (por ejemplo, se pueden extraer células o tejido del ratón para el fin de los ensayos, o analizarse mediante radiografía, IRM, PET, SPECT, BLI, y modalidades de adquisición de imágenes basadas en fluorescencia).

65 En algunas realizaciones de la invención, en dicho modelo de ratón, el antígeno de interés se ha introducido en dicho ratón. El antígeno de interés se puede introducir mediante diversos métodos conocidos por los expertos en la materia.

Algunos métodos no limitantes incluyen la transgénesis, inyección, infección, trasplante de tejido o de células. El antígeno de interés o un fragmento del mismo (por ejemplo, un fragmento que es reconocido por la proteína de unión a antígeno que se está ensayando) puede dirigirse a, o expresarse por, tipos celulares concretos. En algunas realizaciones, el antígeno de interés es un antígeno humanizado de interés codificado por el genoma de ratón.

5 El antígeno de interés puede ser una proteína unida a membrana de tal manera que se expresa solo sobre la superficie de la célula. Como alternativa, el antígeno de interés o un fragmento del mismo (por ejemplo, un fragmento que es reconocido por la proteína de unión a antígeno que se está ensayando) puede presentarse sobre la superficie celular complejado con otra proteína o resto. Algunos antígenos de la superficie celular pueden asociarse con otras proteínas como complejos correceptores, o unirse o tener afinidad con moléculas extracelulares. Por tanto, se puede utilizar el modelo de ratón para ensayar moléculas de unión a antígeno biespecíficas que interactúan con linfocitos T en diversos sistemas celulares.

15 el ratón expresa los dominios extracelulares CD3 ϵ , CD3 δ y CD3 γ humanos. En una realización, el ratón expresa el dominio transmembrana y citoplásmico de ratón de CD3 ϵ , CD3 δ y CD3 γ ; en una realización, los dominios transmembrana y citoplásmico son dominios endógenos de ratón. En una realización, el modelo de ratón expresa CD3 ϵ , CD3 δ y CD3 γ , comprendiendo cada uno un dominio extracelular humano y de ratón, por ejemplo, los dominios transmembrana y citoplásmico de un ratón endógeno.

20 La proteína de unión a antígeno se une a CD3 y al antígeno de interés en el modelo de ratón. En una realización, el antígeno de interés es un antígeno humano. En una realización, el antígeno de interés es un antígeno de primate, por ejemplo, un antígeno de macaco. En una realización, la proteína de unión a antígeno tiene capacidad de unión al mismo antígeno de interés de origen humano y de ratón. En una realización, la proteína de unión a antígeno tiene capacidad de unión a una CD3 humana y de mono.

25 En una realización, el modelo de ratón comprende un xenoinjerto de un tumor que expresa el antígeno de interés. En una realización, la célula que expresa o que comprende el antígeno de interés en dicho ratón es una célula inmortalizada, tal como una célula tumoral. Por tanto, el modelo de ratón se utiliza para ensayar la actividad de las proteínas de unión a antígeno biespecíficas dirigidas contra CD3 en el bloqueo o que afectan la célula tumoral que expresa el antígeno de interés.

30 Por tanto, en la realización de la invención, en donde la célula que expresa o que comprende el antígeno de interés es una célula tumoral, el antígeno de interés puede ser un antígeno asociado a tumor (TAA). Se relacionan diversos antígenos tumorales en la base de datos de antígenos tumorales definidos por linfocitos T (van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. Cancer Immunol 2013). Los antígenos asociados a tumores ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa ALK, proteínas BAGE, BIRC5 (survivina), BIRC7, CA9, CALR, CCR5, CD19, CD20 (MS4A1), CD22, CD27, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44, CD52, CD56, CD79, CDK4, CEACAM3, CEACAM5, CLEC12A, EGFR, EGFR variante III, ERBB2 (HER2), ERBB3, ERBB4, EPCAM, EPHA2, EPHA3, FCRL5, FLT3, FOLR1, proteínas GAGE, GD2, GD3, GPNMB, GM3, GPR112, IL3RA, KIT, KRAS, LGR5, LMP2 derivada de VEB, L1CAM, proteínas MAGE, MLANA, MSLN, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, MUC16, MUM1, ANKRD30A, NY-ESO1 (CTAG1B), OX40, PAP, PAX3, PAX5, PLAC1, PRLR, PMEL, PRAME, PSMA (FOLH1), proteínas RAGE, RET, RGS5, ROR1, SART1, SART3, SLAMF7, SLC39A6 (LIV1), STEAP1, STEAP2, TERT, TMPRSS2, nuevo antígeno de Thompson, TNFRSF17, TYR, UPK3A, VTCN1, WT1. En un ejemplo, como se describe en el Ejemplo 3 del presente documento, el antígeno de interés puede ser CD20, por ejemplo, CD20 humano o humanizado.

45 En otra realización de la invención, el modelo de ratón se usa para determinar si un candidato de una proteína de unión a antígeno biespecífica es capaz de bloquear o afectar a un antígeno de interés que es un antígeno asociado a una enfermedad infecciosa. En una realización de la invención, el ratón se infecta con un agente infeccioso. En una realización de la invención, el antígeno asociado a la enfermedad infecciosa es un antígeno vírico. En un aspecto, el antígeno vírico se selecciona entre el grupo que consiste en VIH, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, virus del herpes (por ejemplo, VHS-1, VHS-2, CMV, VHA-6, VVZ, virus de Epstein Barr), adenovirus, virus de la gripe, flavivirus, ecovirus, rinovirus, virus coxsackie, coronavirus, virus respiratorio sincitial, virus de las paperas, rotavirus, virus del sarampión, virus de la rubeola, parvovirus, virus vaccinia, HTLV, virus del dengue, virus del papiloma, virus de molusco, poliovirus, virus de la rabia, virus JC, virus del ébola, y antígeno del virus de la encefalitis arboviral.

50 En otra realización de la invención, en donde el antígeno de interés es un antígeno asociado a una enfermedad infecciosa, el antígeno de interés es un antígeno bacteriano. En algunos aspectos de la invención, el antígeno bacteriano se selecciona del grupo que consiste en clamidia, rickettsia, micobacterias, estafilococos, estreptococos, neumonococos, meningococos, gonococos, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionella, difteria, salmonela, bacilos, cólera, tétanos, botulismo, ántrax, peste, leptospira, y antígeno bacteriano de la enfermedad de Lyme.

60 En algunos aspectos de la invención, la proteína de unión a antígeno biespecífica basada en CD3 es una proteína de unión a antígeno basada en CD3. En una realización, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

65

- En algunas realizaciones de la invención, el modelo de ratón es un modelo de ratón inmunocompetente. En algunas realizaciones de la invención, el modelo de ratón permite ensayar la eficacia y/o la toxicidad de la proteína de unión a antígeno de interés. Las medidas de la eficacia dependerán del antígeno de interés que está dirigido por el agente biespecífico. En algunas realizaciones, la medida de la eficacia es la destrucción de linfocitos T de la célula que expresa el antígeno. En otras realizaciones, la medida de la eficacia es la neutralización del virus. En otra realización, la medida de la eficacia puede ser la viabilidad del animal. En otra realización más, la medida de la eficacia puede ser la eliminación de las células que expresan el antígeno de interés, la proliferación de linfocitos T, la producción de citoquinas (por ejemplo, IFNg, TNFa, IL-1, IL-2, IL-10, IL4, IL-6, granzima, perforina, etc.)
- En algunas realizaciones de la invención, la toxicidad en el animal puede medirse como un evento adverso en el animal, por ejemplo, el cambio en el peso corporal, apetito, cambios digestivos, cambios en los recuentos de células de la sangre, esplenomegalia, cambios histológicos de los órganos, cambio en función de la enzima hepática, cambios en el análisis de orina, toxicidad orgánica, hemorragia, deshidratación, pérdida de pelo y suciedad, u otros signos de morbilidad. Una medida puede ser la determinación de la reactividad cruzada de la proteína de unión a antígeno con antígenos irrelevantes, que, en una realización, puede detectarse mediante histología de órganos, específicamente, la detección de la proteína de unión a antígeno en tejidos o tipos de células que no son conocidos por expresar el antígeno de interés.

Uso de animales no humanos genéticamente modificados

- La invención proporciona también diversos métodos de utilizar los ratones genéticamente modificados descritos en el presente documento.
- En una realización, se proporciona en el presente documento para cribar fármacos candidatos terapéuticos que se dirigen a un antígeno de interés que comprende (a) proporcionar o recibir un ratón genéticamente modificado que comprende en su locus CD3 endógeno de ratón una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de una CD3ε, CD3δ y CD3γ humana, (b) introducir en dicho ratón genéticamente modificado un antígeno de interés, (c) poner en contacto dicho ratón con un fármaco candidato de interés, en donde el fármaco candidato se dirige contra la CD3 humana y el antígeno de interés, y (d) determinar si el fármaco candidato es eficaz en la prevención, la reducción o la eliminación de células caracterizadas por la presencia o la expresión del antígeno de interés. en el ratón expresa una proteína CD3 humanizada funcional, sobre la superficie de sus linfocitos T. el ratón genéticamente modificado comprende en el locus CD3 endógeno de ratón una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de CD3ε humana, un dominio extracelular de CD3δ humana y un dominio extracelular de CD3γ humana. En una realización del método que se describe en el presente documento, el ratón no comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular funcional de las proteínas de ratón correspondientes. En algunas realizaciones del método, el(los) dominio(s) extracelular(es) de la(s) proteína(s) CD3 humana(s) está(n) unido(s) operativamente al(a los) dominio(s) transmembrana y citoplásmico de la(s) proteína(s) CD3 endógenas(s) de ratón correspondiente(s). En diversas de dichas realizaciones no limitantes de los métodos, el dominio extracelular de una CD3ε humana se muestra en la SEQ ID NO: 33, el dominio extracelular de CD3δ humana se muestra en la SEQ ID NO: 34, y el dominio extracelular de CD3γ humana se muestra en la SEQ ID NO: 35. En diversas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, el ratón puede expresar una proteína CD3ε humanizada que se muestra en la SEQ ID NO: 24, Una proteína CD3δ humanizada que se muestra en la SEQ ID NO: 25 y la CD3γ humanizada que se muestra en la SEQ ID NO: 26.
- En varias realizaciones del método descrito en el presente documento, la introducción del antígeno de interés en el ratón genéticamente modificado descrito en el presente documento puede llevarse a cabo mediante cualesquiera métodos conocidos por el experto en la materia, que pueden incluir, sin limitación, la transgénesis, inyección, infección, trasplante de tejido o de células. Como tal, se puede conseguir la introducción expresando en el ratón el antígeno de interés, que puede comprender modificar genéticamente dicho ratón para expresar el antígeno de interés. Como alternativa, la introducción puede comprender introducir en dicho ratón una célula que exprese el antígeno de interés, por ejemplo, como en el trasplante de una célula o tejidos. La introducción puede comprender también infectar dicho ratón con el antígeno de interés, por ejemplo, como en una infección bacteriana o vírica. En una realización, el antígeno de interés puede ser un antígeno de interés humano. En otra realización, puede ser un antígeno bacteriano o vírico de interés.
- El antígeno de interés puede ser un antígeno asociado a tumor, como se ha descrito en detalle anteriormente. el antígeno de interés puede ser un antígeno asociado a una enfermedad infecciosa, por ejemplo, un antígeno bacteriano o vírico, como se ha descrito en detalle anteriormente.
- En algunas realizaciones de los métodos de cribado de un fármaco candidato terapéutico, el fármaco candidato puede ser una proteína de unión a antígeno, por ejemplo, un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. En diversos aspectos, dicho fármaco candidato tiene capacidad de unión a la CD3 humana y al antígeno de interés. el antígeno de interés puede ser un antígeno humano. el antígeno de interés puede ser un antígeno de primate, por ejemplo, un antígeno de mono. Por tanto, el fármaco candidato usado para el cribado puede tener capacidad de unión al antígeno humano y a un antígeno de primate correspondiente, además de unirse a CD3 humana. el fármaco candidato puede ser también capaz de unirse a una CD3 de primate, por ejemplo, de mono. Por tanto, el fármaco candidato puede

tener capacidad de unión a una CD3 de humano y de primate, por ejemplo, de mono; y también, en una realización, ser capaz de unirse a un antígeno humano de interés. En otra realización, el antígeno de interés puede ser un antígeno bacteriano o vírico, y el fármaco candidato puede tener capacidad de unión a la CD3 humana y de primate, por ejemplo, CD3 de mono, y el antígeno bacteriano o vírico de interés.

5 En algunos aspectos, el candidato terapéutico es un anticuerpo, que es un anticuerpo humano. En otros aspectos, puede ser un anticuerpo humanizado. Por ejemplo, el candidato terapéutico puede ser un anticuerpo generado en ratones VELOCIMMUNE® (patente de Estados Unidos n.º 8.502.018, por tanto, el anticuerpo candidato inicial puede comprender una región variable humana y una región constante de ratón. La región constante de ratón del anticuerpo candidato puede rediseñarse para ser de origen humano expresando la región variable humana seleccionada en ratones VELOCIMMUNE® en enlace operativo con una región constante humana.

15 En varias realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, el candidato terapéutico es capaz de reducir, eliminar, o prevenir una enfermedad. En una realización, la enfermedad es un tumor, y el candidato terapéutico es capaz de reducir, eliminar o prevenir el crecimiento del tumor en comparación con un agente que no se dirige al antígeno de interés. En dicha realización del método, la determinación de si el fármaco candidato es eficaz en la prevención, la reducción o la eliminación de células caracterizadas por la presencia o expresión del antígeno de interés puede llevarse a cabo usando un ensayo de volumen tumoral, un ensayo de destrucción de células tumorales, inducción de marcadores apoptóticos en tumores, reducción del crecimiento de vasos sanguíneos en tumores, infiltración de células inmunitarias en tumores, etc. En otra realización, la enfermedad es una enfermedad infecciosa, y el candidato terapéutico es capaz de reducir, eliminar, o prevenir una infección bacteriana o vírica en comparación con un agente que no se dirige al antígeno de interés. En dicha realización del método, la determinación de si el fármaco candidato es eficaz en la prevención, reducción o eliminación de células caracterizadas por la presencia o expresión del antígeno de interés puede llevarse a cabo usando una medida de los títulos bacterianos o víricos, la inducción de marcadores apoptóticos en células infectadas, etc.

30 se divulgan también otros métodos de uso de los ratones CD3 humanizados de la presente invención. Por ejemplo, el animal no humano, por ejemplo, un ratón CD3 humanizado, divulgado en el presente documento se puede usar para estudiar el mecanismo de acción del fármaco. Antes del desarrollo del presente animal, era difícil estudiar el mecanismo de acción del fármaco ya que dichos estudios no se llevaban a cabo normalmente en seres humanos y primates, y se requiere a menudo un modelo animal inmunocompetente. La comprensión del mecanismo de acción del fármaco puede conducir al desarrollo de mejores anticuerpos. En diversas realizaciones de la invención, el ratón CD3 humanizado es un ratón inmunocompetente. Por ejemplo, el ratón CD3 humanizado de la invención, lo que comprende un sistema inmunitario normal sano con un desarrollo intacto y un complemento completo de todos los tipos de células inmunitarias y unas rutas de señalización inmunitaria intactas, pueden usarse para estudiar los efectos de diversos candidatos terapéuticos sobre tipos de células específicos, citoquinas, quimioquinas, etc. A continuación, el ratón puede utilizarse para responder preguntas mecanicistas que se refieren a la función del fármaco candidato.

40 Además, el ratón CD3 humanizado se puede utilizar en métodos que implican ensayar el efecto de los fármacos candidatos dirigidos contra CD3 biespecíficos sobre los injertos tumorales. Los modelos de ratón anteriormente desarrollados eran modelos de ratón inmunocomprometidos para permitir el injerto tumoral humano adecuado. El ratón CD3 humanizado es completamente inmunocompetente y permite la introducción y el crecimiento de células tumorales que expresan el antígeno de interés, de tal manera que afectan por completo la respuesta inmunitaria que se puede estudiar, incluyendo aunque no de forma limitativa responder preguntas mecanicistas, preguntas sobre toxicidad temprana, preguntas sobre eficacia temprana, etc.

50 En otras realizaciones más, el ratón CD3 humanizado se puede utilizar para estudiar los efectos de la combinación de terapias farmacológicas en modelos animales, específicamente la combinación de terapias farmacológicas, por ejemplo, cuando un fármaco es una proteína de unión a antígeno que se une a CD3 y otro fármaco es un agente que se ha homologado anteriormente para una indicación concreta. Se pueden abordar preguntas específicas relacionadas con la dosificación de los fármacos y sus efectos en un modelo animal antes de cualquier ensayo humano.

Ejemplos

55 Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de describir para los expertos en la materia como preparar y usar los métodos y composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores de la presente invención consideran como su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. Los Ejemplos no incluyen descripciones detalladas de métodos convencionales que serían bien conocidos por los expertos en la materia (técnicas de clonación molecular, etc.). A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio, la temperatura se indica en grados Celsius, y la presión es la atmosférica o casi atmosférica.

Ejemplo 1. Construcción del locus CD3 humanizado

65 **Ejemplo 1,1. Construcción de CD3 γ δ ϵ humanizado**

El locus CD3 de ratón se humanizó mediante la construcción de un único vector de direccionamiento a partir de ADN (BAC) de cromosoma artificial bacteriano humano y de ratón utilizando la tecnología VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 6.586.251 y Valenzuela *et al.* (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. *Nat. Biotech.* 21(6): 652-659). Se modificó el ADN del clon BAC bMQ-425K11 de ratón mediante recombinación homóloga para sustituir el ADN genómico que codifica parte de los genes CD3ε, CD3δ y CD3γ (genes CD3 de ratón localizados en estrecha proximidad entre sí en el cromosoma 9) con las porciones de los genes CD3ε, Cd3δ y CD3γ derivados de BAC RP11-414G21 humano (los genes CD3 humanos se localizan en estrecha proximidad entre sí en el cromosoma 11), respectivamente.

Específicamente, Para generar los ratones CD3γδε humanizados, se modificó en primer lugar el ratón BAC sustituyendo 714 pb de la secuencia Cd3d de ratón (que corresponde a la secuencia parcial del gen Cd3d de ratón que codifica los exones 2-3) por 939 pb de la secuencia CD3D humana (que corresponde a la secuencia parcial del gen CD3D humano que codifica los exones 2-3) en un único evento director utilizando un vector de direccionamiento que comprende un casete Spec que utiliza brazos de homología de ratón.

Un ratón BAC que comprende una sustitución de la secuencia parcial del gen CD3d de ratón que codifica los exones 2-3 por la secuencia humana correspondiente se modificó posteriormente mediante la sustitución de 1.738 pb de la secuencia Cd3g de ratón (que corresponde a la secuencia parcial del gen Cd3 g de ratón que codifica los exones 2-4) por 1.639 pb de la secuencia CD3G humana (que corresponde a la secuencia parcial del gen Cd3 g humano que codifica los exones 2-4) también en un único evento de direccionamiento usando otro vector que contiene un casete Spec y los brazos de homología de ratón.

Por último, el BAC que comprende la sustitución de los genes CD3d y CD3g de ratón por los genes humanos correspondientes se modificó adicionalmente sustituyendo 6.213 pb de la secuencia CD3e de ratón con 6.817 pb de la secuencia humana (que corresponde a la sustitución de la secuencia parcial del gen CD3e de ratón que codifica los exones 2 a 4 con la secuencia parcial del gen CD3E humano que codifica los exones 2 a 5). Se insertó un casete de neomicina floxado de 4.996 pb en la dirección 5' de la secuencia CD3E humana inactivada.

El vector de direccionamiento grande humanizado resultante para la inserción en células ES se representa en la FIG. 2A, indicando A, B, C, D, E, F, y G diversas uniones de casetes de ratón/humano o casetes de ratón/NEO o casetes humano/NEO. Las secuencias en las uniones se representan en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1. Secuencias de unión del vector de direccionamiento grande

Designación de secuencias en la FIG. 1	Unión	Secuencia	SEQ ID NO:
A	casete Cd3e/ Xho I/(loxP) de ratón en 5'	CGACTTTCTTGACTTCTATTTGTTA AACACTGTGCATTCACATCGAATGC TAGAAGTTTCCTCGTCCCGCTTCT CCTGAATTGCCTGGGATCCTCTGCT TGATGCCCTGTAGGAAACGTCCTTT CCTGTGGTATAGAAATGACTG/ CTC GAG/ATAACTTCGTATAATGTATGC TATACGAAGTTAT ATGCATGGCCTC CGCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGC	1
B	casete (loxP) I ce U// CD3E humano en 3'	TGTATCTTATCATGTCTGGA ATAAC TTCGTATAATGTATGCTATAACGAAG TTAT GCTAGTAACTATAACGGTCC AAGGTAGCGAGCTAGC//CTTCCAC AGACACCAATGTTCAAAATGGAGGC TTGGGGCAAATTCCTTTTGCTATG TCTCTAGTCGTCCAAAAAATGGTCC TAACTTTTTCTGACTCCTGCTTGTC AAAAATTGTGGGCTCATAGTTAATGC	2

(continuación)

Designación de secuencias en la FIG. 1	Unión	Secuencia	SEQ ID NO:
C	CD3E humana/Cd3e de ratón en 3'	AGGGGAGAATGGCCTTCATGCACTCC CTCCTCACCTCCAGCGCCTTGTGTTT TCCTTGCTTAGTGATTTCCCCTCTCC CCACCCACCCCCACAGTGTGTGAG AACTGCATGGAGATGGATGTGATGTC GGTG/GCCATAATCATCATTGTTGAC ATCTGTATCACTCTGGGCTTGCTGAT GGTCATTTATTACTGGAGCAAGAATA GGAAGGCCAAGGCCAAGCCT	3
D	Cd3d de ratón/CD3D humana en 3'	GAAAGAGAGAGTCTTTCTGCTAACTA ACCCCAGAAGGCCTTCCGGTCTCAT GTCCTGCAAAGCAGTAGACGCCAAA GCCAGGAGCAGAGTTGCGATGAGGTC AATGAAGATGACACC/AGCCACGGTG GCTGGATCCAGCTCCACACAGCTCTG GCACACTGTGGGGGAAGGGAGGAGAG AGGAGAGGTTGAGAGCCTTTAAGATC AGGAACCATCCT	4
E	CD3D humana/ SgrDI /Cd3d de ratón en 5'	CAAGAGAGACAGAAGTCACAAGAAAA AGCCTTCAGAAAGTTCCCCACCAACT GCAGGGGTCAAGGGGGACATGAGGAT GCCATTCAAG/ CGTCGACG /AGCGTA GGCAGCTTATTGCTCTGCATACTTAC AGACCATTTGTGTAGTAAGGGACATG ATGCCGAGTGAAAGGGGCAGGAGCAA CCAGAGGGAGATTTTCAGGAAGTTCTC CAGGGACTCGAGGTTTCGTGA	5
F	Cd3 g de ratón/ AsisI /CD3G humana en 5'	GAAGCCCCACCCAGAAAGGTAGGACAA AGATCATAGTCATATTTACTTCATCCA GGAGAGAAACACAGACACAGCCATTGC CTTGGCCATCATCTCTCTCCATCTTGA CCTCACGTGATCATG/ GCGATCGC /GA GTGATTTAGTCTACAATCCGAAAACCT AAGTATAGATACTACCATTTTCATGGA TTTGGATCTTTCTTCATCTTGGCCTCA AATAACCATG	6
G	CD3G humana/Cd3g de ratón en 3'	GCATTATTGCAGACAGGCAGGAGAAAA CGAACCAGGAAAAACAACCTTTTCGCAAC CTGAAGGTTTTGTCTCTCCTTTTCCCTA CAGTGTGTCAGAACTGCATTGAACTAA ATGCAGCCACCATATCT/GGCTTTATC TTCGCTGAGGTCATCAGCATCTTCTTC CTTGCTCTTGGTGTATATCTCATTGCG GGACAGGATGGACAATACCCTGTCTTA A	7

Se usó el ADN dirigido a BAC para electroporar células ES de ratón que comprenden una delección en el locus CD3 de ratón para crear células ES modificadas para generar ratones que expresan CD3ε, CD3δ y CD3γ sobre la superficie de sus linfocitos T. Se identificaron células ES que contenían inserciones de las secuencias CD3ε, CD3δ y CD3γ mediante un ensayo TAQMAN™ cuantitativo (véase, por ejemplo, Lie y Petropoulos, 1998. Curr. Opin. Biotechnology 9:43-48. Se diseñaron conjuntos y sondas específicos de cebadores para detectar la inserción de secuencias humanas (ganancia de alelos, GOA) y la delección de secuencias de ratones (pérdida de alelos, LOA). La Tabla 2 identifica los nombres y localizaciones de cada uno de los cebadores/sondas usadas en los ensayos de la PCR cuantitativa.

5

Tabla 2: Parejas de cebadores/sondas usados para genotipar

Gen	Nombre de la secuencia	Ensayo	Cebador directo	Sonda (BHQ)	Cebador inverso
Cd3e de ratón	968 mTU	LOA	CCTCTGCCATG TAGGTTTGTG TAC (SEQ ID NO:9)	TGCCGTGATGT TTGTTCAATGA CCAAA (SEQ ID NO:10)	GTTCTGAG AAAGGCCGT TCTTAAAGTG (SEQ ID NO:11)
Cd3 g de ratón	7164 mTD	LOA	CCAGGGCTACT TGCTGTTCTG (SEQ ID NO:12)	TGGGCTTACCAT CCAGGACGA (SEQ ID NO:13)	GCTACTCTTC CCACAAACTG CTTAG (SEQ ID NO:14)
CD3E humana	7170 hTU	GOA	CCAGCAGTAAG TTCCACTGTTT TAG (SEQ ID NO:15)	TGTAGAAATGG CTGTGACCCAGCA (SEQ ID NO:16)	GGGCTGTGTT GCAGTATGAC (SEQ ID NO:17)
CD3D humana	928 hTU	GOA	ACCGTGCAAGT TCATTATCGAAG (SEQ ID NO:18)	ACGTGCTTCCTG AACCCTTTGGGT (SEQ ID NO:19)	TCTCACATCCA GAAAGCCCTATC (SEQ ID NO:20)
CD3G humana	7164 hTD	GOA	CGAGGGATGTA TCAGTGTAAG GA (SEQ ID NO:21)	CACAGAACAAAGT CAAAACCACTCC AAGTG (SEQ ID NO:22)	GCTCACAGAA CAGCAAATACTG (SEQ ID NO:23)

- 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 Estados Unidos n.º 7.294.754 y Poueymirou *et al.* (2007) los ratones de la generación F0 que se derivaron esencialmente de forma completa del gen donante dirigido a las células ES lo que permite los análisis fenotípicos inmediatos Nature Biotech. 25(1):91-99). VELOCIMICE® (ratones F0 completamente derivados de la célula ES donante) que soportaban independientemente genes CD3 humanizados se identificaron mediante genotipación usando una modificación del ensayo de alelos (véase anteriormente) que detecta la presencia de las secuencias únicas del gen CD3 humano.
- El casete de selección puede eliminarse mediante métodos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, las células ES que soportan el locus CD3 humanizado pueden transfectarse con una construcción que expresa Cre a fin de retirar el casete floxado. El casete de selección puede retirarse opcionalmente reproduciéndolo en ratones que expresan Cre recombinasa. Opcionalmente, el casete de selección es retenido en los ratones. La unión ratón/humana del alelo CD3ε humanizado tras la retirada del casete de selección (representado como A-B en la FIG. 2B), se presenta en la Tabla 3 siguiente. Las secuencias de unión restantes son las mismas que en el vector de direccionamiento y se presentan en la Tabla 1 anterior.

Tabla 3. Secuencias de unión del alelo humanizado

Designación de secuencias en la FIG. 1B	Unión	Secuencia	SEQ ID NO:
A-B	Cd3e de ratón/XhoI/Lox/IceUI //CD3E humana en 5'	CGACTTCTTGACTTCTATTTGTTAAA CACTGTGCATTCACATCGAATGCTAGA AGTTTCCTCGTCCCGCTTCCCTCCTGAA TTGCCTGGGATCCTCTGCTTGATGCC TGTAGGAAACGTCCTTTCCTGTGGTAT AGAAATGACTG/ CTCGAG/ATAACTTC GTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT/ GCTAGTAACTATAACGGTCCTAAGGTA GCGAGCTAGC//CTTCCACAGACACCA ATGTTCAAATGGAGGCTTGGGGGCAA AATTCTTTTGCTATGTCTCTAGTCGTC CAAAAATGGTCCTAACTTTTTCTGAC TCCTGCTTGTCAAAAATTGTGGGCTCA TAGTTAATGC	8

- la secuencia de las proteínas CD3ε, CD3δ, y CD3γ humanizadas resultantes, se representa en la FIG 3 y se incluye en el listado de secuencias. Adicionalmente, el alineamiento de las secuencias de ratón-humana y de las uniones en 5' y 3' de la secuencia humana insertada se muestran en la FIG. 4 como * y **, respectivamente. Números de registro de proteínas del GenBank para proteínas CD3ε, CD3δ y CD3γ se resumen a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4 Números de registro de proteínas del GenBank

Nombre de la proteína	N.º de registro de ratón (SEQ ID NO)	N.º de registro humano (SEQ ID NO)
CD3ε	NP_031674 (SEQ ID NO: 27)	NP_000724 (SEQ ID NO: 28)
CD3δ	NP_038515 (SEQ ID NO: 29)	NP_000723 (isoforma A) (SEQ ID NO: 30)
CD3γ	NP_033980 (SEQ ID NO: 31)	NP_000064 (SEQ ID NO: 32)

Ejemplo 2. Caracterización de Ratones CD3 Humanizados

Ejemplo 2.1. Desarrollo de células inmunitarias en ratones CD3 humanizados

- Se evaluó el desarrollo de células inmunitarias en el timo y la periferia de ratones con una CD3εδγ humana usando el análisis de la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y el recuento diferencial de células. Se recogieron ganglios del timo, bazo y linfáticos de las cohortes de ratones de tipo silvestre (WT, CD3γδε no humanos), heterocigóticos (Het, un alelo hCD3γδε) y homocigóticos (Ho, dos alelos hCD3γδε). Se obtuvo sangre periférica mediante punción cardíaca o sangrado retroorbital en tubos Microtainer revestidos con EDTA (BD). Se prepararon suspensiones de células individuales a partir del bazo, LN y timo usando perturbación mecánica, y se retiraron glóbulos rojos del bazo, timo y sangre completa mediante lisis con un tampón de lisis AKC. Se incubaron las células durante

10 minutos a temperatura ambiente con anticuerpos purificados para CD16/CD32 (FcBlock) para bloquear la unión no específica mediante receptores Fc, y a continuación se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con un cóctel de anticuerpos conjugados directamente a marcadores de linfocitos T y B. Las células se lavaron dos veces con PBS frío que contenía BSA al 1 %, se resuspendieron en tampón y se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo FACSCanto II™ (BD Biosciences). Se identificaron los timocitos en primer lugar mediante clasificación por dispersión hacia adelante y lateral, y clasificando a continuación la población de B220. En la periferia, Se identificaron los linfocitos T como CD45+/TCRb+/B220-, y se identificaron los linfocitos B como CD45+/TCRb-/B220+. Se obtuvieron los recuentos absolutos en un Analizador hematológico Hemavet 950FS.

10 Como se demostró en las FIGS. 5A y 5B, los ratones CD3γδε humanizados parecieron tener un desarrollo de timocitos normal y relaciones de linfocitos T y linfocitos B normales en el timo, la sangre periférica, y el bazo. Adicionalmente, Los porcentajes de linfocitos T y linfocitos B parecieron normales en los ganglios linfáticos, y los recuentos celulares absolutos de los ganglios del bazo y linfáticos (no se muestran los datos) estuvieron dentro del intervalo normal. las cantidades de linfocitos CD4 y CD8 en la sangre fueron similares entre los ratones WT, Het, y Ho. Los glóbulos blancos en circulación, linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, y basófilos parecieron todos dentro del intervalo normal (no se muestran los datos). Por tanto, se observó el desarrollo de células inmunitarias normales en los ratones CD3εδγ humanizados.

20 A fin de determinar si los ratones CD3εδγ humanizados presentaron un repertorio de linfocitos T Vβ CD4+ y CD8+ policlonal, se aislaron esplenocitos de cuatro ratones del control emparejados por cepa y cinco ratones humanizados y se examinaron para la utilización de TCR Vβ. Se extrajeron los bazos y se prepararon esplenocitos individuales como se ha descrito anteriormente. Se incubaron las células durante 10 minutos a temperatura ambiente con anticuerpos purificados para CD16/CD32 (FcBlock; Biolegend) para bloquear la unión no específica mediante receptores Fc, y a continuación se resuspendió en un cóctel de anticuerpos conjugados directamente a CD4 de ratón (Biolegend) y a CD8 de ratón (Biolegend). Los anticuerpos conjugados directamente al TCR Vβ se añadieron a continuación a los pocillos individuales y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Se lavaron las células con PBS frío y se incubaron con un colorante de viabilidad para tinción de células muertas (LIVE/DEAD Fixable Aqua, Life Technologies) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células con PBS frío que contenía FBS al 2 %, a continuación se resuspendieron en tampón y se fijaron con tampón de estabilización BD antes de analizarse mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo LSR Fortessa™ (BD Biosciences). Se identificaron los linfocitos T CD4 y CD8 en primer lugar mediante clasificación por dispersión hacia adelante y lateral, y a continuación, clasificando la población viva. A continuación se examinaron los linfocitos T CD4 (CD4+CD8-) y los linfocitos T CD8 (CD4-CD8+) para la utilización de TCR Vβ.

35 Como puede verse a partir de la FIGURA 5C, el repertorio Vβ usado por los linfocitos T CD4 y CD8 en los ratones CD3εδγ humanizados muestra policlinalidad, con una utilización no significativamente diferente de los ratones del control emparejados por cepa.

40 **Ejemplo 2.2. Respuesta de los linfocitos T a la infección en ratones CD3 humanizados**

Para determinar si los ratones CD3 humanizados (ratones CD3γδε humanizados) presentaron una respuesta normal a la infección, se ensayó la capacidad de los ratones humanizados de clarificar el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV). LCMV es un virus trópico de ratón, donde el desarrollo de la infección depende de la cepa vírica. La infección con la cepa Armstrong da como resultado una infección aguda, donde los ratones pueden desarrollar rápidamente una respuesta de linfocitos T contra el virus y clarificar la infección en aproximadamente una semana. Por otro lado, El clon 13 del virus no se puede clarificar, y los linfocitos T llegan a "agotarse" y se establece una infección crónica. Ya que las infecciones crónicas y agudas dependen de la actividad de los linfocitos T, LCMV es un modelo ideal para ensayar la función de los linfocitos T.

50 Se infectaron ratones CD3 humanizados o ratones del control emparejados por cepa de 6-8 semanas con 2x10⁵ ufc de la cepa Armstrong por vía i.p. y/o 2x10⁶ ufc del clon 13 por vía i.v. para la infección del clon 13, dos semanas después de la infección se extrajeron los bazos y se midieron los títulos víricos mediante el ensayo de placas. Los títulos víricos fueron similares en los ratones del control y los ratones huCD3 (FIG. 6A), indicando que la humanización de CD3 no tiene un efecto sobre el fenotipo agotado de los linfocitos T, ya que los linfocitos T pueden controlar el virus a niveles similares en ambas cepas de ratones. Para la infección por la cepa Armstrong, dos semanas después de la infección de la cepa Armstrong inicial, se estimularon los ratones con el clon 13 y dos semanas después de la estimulación del clon 13 se midieron los títulos víricos en los bazos. No se detectó virus tanto en los ratones del control como en los ratones CD3 humanizados (FIG. 6B). Los datos sugieren que se clarificó la infección por Armstrong aguda. Además, esto demuestra que la memoria de los linfocitos T que se estimuló a partir de la infección por Armstrong fue suficiente para proteger a los ratones de la infección del clon 13 posterior en ambas cepas de ratones.

65 **Ejemplo 3. Ratones CD3 humanizados como un modelo para ensayar candidatos terapéuticos basados en anticuerpos dirigidos contra CD3**

Ejemplo 3.1. CD3 de ratón humanizada para ensayar la reactividad cruzada del macaco mediante los anticuerpos dirigidos contra CD3 humana

5 Se ensayó la capacidad de diferentes anticuerpos dirigidos contra CD3 restringidos a ser humano o reactivos en cruzado con macaco de unirse a esplenocitos procedentes de ratones de tipo silvestre (WT) o ratones CD3 $\gamma\delta\epsilon$ humanizados (Ho = homocigóticos, Het = heterocigóticos) usando el análisis de la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

10 Se incubaron esplenocitos aislados recientemente (2×10^5 por pocillo) con anticuerpos dirigidos contra CD3 (15 ug/ml) durante 30 minutos a 4 °C. Durante la incubación, se lavaron las células dos veces y se añadieron anticuerpos secundarios adecuados (por ejemplo, anticuerpo PE dirigido contra IgG humana con etiqueta fluorescente y anticuerpos conjugados directamente con marcadores de linfocitos T) y se incubaron durante 30 minutos más a 4 °C, a continuación se lavaron dos veces. Se usaron los anticuerpos siguientes: ah/mfCD3-2 y ah/mfCD3-1 son dos anticuerpos que reconocen la CD3 humana y de mono; ahCD3-2 y ahCD3-1 son dos anticuerpos que reconocen solo la CD3 humana, amCD3-2C11 es un anticuerpo que reconoce solo la CD3 de ratón, la IgG humana del control es un anticuerpo del control sin relacionar y el 2° es un anticuerpo secundario solo del control. Las células se lavaron dos veces con PBS frío que contenía BSA al 1 %, se resuspendieron en tampón y se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo FACSCanto II™ (BD Biosciences). Se identificaron los linfocitos T como CD45+/TCRb+/B220-. Se usaron anticuerpos dirigidos contra mCD3-2C11 diseñados para contener hlgG1 para identificar linfocitos T en esplenocitos de ratón WT.

20 Como se demuestra en la FIG. 7, los anticuerpos dirigidos contra CD3 que reconocieron solo la CD3 humana fueron capaces de unirse a CD3 sobre la superficie de los esplenocitos procedentes de ratones CD3 $\gamma\delta\epsilon$ humanizados; de manera similar, los anticuerpos dirigidos contra CD3 que reconocieron solo la CD3 humana y de mono fueron capaces de unirse a CD3 sobre la superficie de los ratones CD3 $\gamma\delta\epsilon$ humanizados. Por tanto, los ratones humanizados para las tres CD3 ϵ , CD3 δ y CD3 γ son relevantes para los estudios preclínicos en fase temprana de fármacos candidatos basados en CD3 que puede continuarse por estudios de eficacia y toxicidad basados en macacos.

Ejemplo 3.2. Activación de linfocitos T en ratones CD3 humanizados

30 Se ensayó la capacidad de los anticuerpos dirigidos contra CD3 humana de estimular una respuesta inmunitaria en ratones CD3 humanizados. Ratones humanizados para CD3 $\gamma\delta\epsilon$ (n de 2/grupo), se inyectaron intraperitonealmente con 10 ug de anticuerpos dirigidos contra CD3 restringidos a seres humanos o reactivos en cruzado con macacos (todos hlgG1). Para obtener los niveles de composiciones celulares y citoquinas en plasma, la sangre se extrajo en tubos Microtainer revestidos con EDTA (BD) desde el seno retroorbital comenzando 2 horas después de la inyección. Se evaluó el número de linfocitos T y linfocitos B periféricos mediante FACS. En resumen, se incubaron 50 ul de sangre completa durante 30 minutos a 4 °C cóctel de anticuerpos conjugados directamente a marcadores de linfocitos T y linfocitos B. Se retiraron los glóbulos rojos mediante lisis con tampón de lisis AKC, y las células etiquetadas se lavaron una vez con PBS frío que contenía BSA al 1 %. Después del lavado, las células se resuspendieron en tampón frío y se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo FACSCANTO 11™ (BD Biosciences). Se identificaron los linfocitos T como CD45+/TCRb+/B220- vivos, y se identificaron los linfocitos B como CD45+/TCRb-/B220+. Se determinaron los recuentos de células absolutos añadiendo una cantidad conocida de perlas de recuento absoluto CountBright™. Se evaluaron los niveles de citoquinas en plasma usando un Kit Mouse ProInflammatory 7-Plex Ultra-Sensitive Kit (Meso-Scale Discovery) a partir de sangre obtenida 2 horas después de la inyección.

45 Como se demuestra en la FIG. 8A, la inyección de 10 ug de anticuerpos dirigidos contra CD3 indujo un agotamiento transitorio de linfocitos T y B, que se restauró en última instancia en el día 4 tras el tratamiento inicial con anticuerpos. Adicionalmente, la inyección de anticuerpos dirigidos contra CD3 (anticuerpos dirigidos contra CD3 que reconocen solo la CD3 humana (ahCD3-1 y ahCD3-3) y anticuerpos dirigidos contra CD3 que reconocen la CD3 humana y de mono (ah/mfCD3-1 y ah/mfCD3-2)) indujo la producción de citoquinas en ratones CD3 $\gamma\delta\epsilon$ humanizados (Fig. 8B).

50 Además, Se evaluó la capacidad de los anticuerpos dirigidos contra CD3 humana, los anticuerpos dirigidos contra CD3 humana/de macaco o los anticuerpos dirigidos contra la de ratón para inducir la proliferación de esplenocitos obtenidos de ratones CD3 $\gamma\delta\epsilon$ de tipo silvestre o humanizados utilizando la cuantificación catalizada por ATP (CellTiter Glo®). La activación de los esplenocitos de ratón da como resultado la liberación de citoquinas, que activan la proliferación celular. Se adquirieron los datos de proliferación utilizando el siguiente protocolo: se añadieron esplenocitos (5×10^5 /pocillo) derivados de ratones de tipo silvestre (WT) o ratones CD3 $\gamma\delta\epsilon$ homocigóticos humanizados (hCD3 $\gamma\delta\epsilon$ Ho) a placas de 96 pocillo que se habían revestido durante la noche a 4 °C con cantidades decrecientes de anticuerpos dirigidos contra CD3, reactivos en cruzado con macaco, o específicos de murino. Se añadieron 500 ng/ml de anticuerpos dirigidos contra CD28 de ratón a los cultivos y se incubaron las placas durante 72 h a 37 °C. Tras la incubación, se añadió CellTiter Glo® y se midió la luminiscencia usando un lector de placas multietiqueta VICTOR X5 (PerkinElmer). Se determinó la CE50 de viabilidad celular (cuantificación catalizada por ATP) usando Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Los valores se calcularon utilizando un análisis de regresión no lineal de 4 parámetros.

65 Como se demuestra en la FIG. 9, los esplenocitos de ratones CD3 $\gamma\delta\epsilon$ humanizados se indujeron para proliferar con anticuerpos que reaccionan en cruzado con CD3 de macaco.

En la FIG. 10 se presenta un sumario de diversas propiedades de ratones WT y CD3 $\gamma\delta\epsilon$. Tal como se puede observar,

los linfocitos de ratones CD3 $\gamma\delta\epsilon$ son capaces de unirse a anticuerpos dirigidos contra CD3 humana y responder a los anticuerpos dirigidos contra la CD3 humana, particularmente aquellos que se conocen por reaccionar en cruzado con la CD3 de ratón, que es un aspecto importante para los agentes terapéuticos ya que los estudios preclínicos en fármacos candidatos se llevan a cabo a menudo en animales grandes tales como macacos.

5

Ejemplo 3.3. Estudios de agotamiento del tumor en ratones CD3 humanizados

Ratones doblemente humanizados para CD3 (ratones CD3 $\gamma\delta\epsilon$ humanizados descritos anteriormente) y CD20 se produjeron cruzando ratones humanizados en el locus CD3 con ratones humanizados en el locus CD20. Los animales resultantes expresaron ambas proteínas humanizadas. Específicamente, Para producir ratones CD20 humanizados, la región de codificación Ms4a1 completa de ratón (Cd20) desde el 2º aminoácido (siendo el primero Met, que está en común) de 167 pb en la dirección 3' de la región sin traducir, que abarca 9312 pb (Murine Chr. 19) se sustituyó por la región de codificación de CD20 humana correspondiente desde el 2º aminoácido hasta 107 pb en la dirección 3' de la región sin traducir, que abarca 8482 pb (Human Chr.11). Ambas DC20, de ratón y humana, tienen seis exones. Los animales usados en el experimento descrito a continuación eran homocigóticos para las sustituciones en ambos loci, CD3 y CD20 y produjeron mediante cruzamiento, ratones modificados en los loci individuales.

10

15

Los ratones CD3/CD20 humanizados se implantaron por vía subcutánea con 2×10^5 células B16F10.9 tumorales de melanoma transducidas con CD20 humana. comenzando en el Día 0 (día de trasplante del tumor), los ratones se trataron por vía intraperitoneal 2 veces por semana tanto por semana (PBS; n=5), como con Ab 2 del control 0,4 mg/kg (anticuerpo del control que no muestra reactividad cruzada con el antígeno de CD20; n=5), 0,4 mg/kg de Ab 1 (anticuerpo biespecífico dirigido contra CD3/CD20, véase el documento WO2014121087A1, publicado el 7 de agosto de 2014, N=5), o 0,004 mg/kg Ab 1 (n=5). Los volúmenes tumorales se midieron como se indica en la Fig. 11A. Se sacrificaron los ratones cuando los tumores alcanzaron el volumen máximo de aproximadamente 1500 mm³. Como se demuestra en la FIG. 11A, el tratamiento con Ab 1 retrasó el crecimiento tumoral cuando se inició el tratamiento simultáneamente con el trasplante del tumor.

20

25

En un experimento distinto, se ensayó también la capacidad de Ab 1 de inhibir el crecimiento tumoral en un tumor ya establecido (Fig. 11B). Se implantaron ratones CD3/CD20 humanizados por vía subcutánea con 2×10^5 células B16F10.9 tumorales de melanoma que expresaban CD20 humana. En el día 10 después del implante, se aleatorizaron los ratones basándose en el tamaño tumoral y se organizaron en los siguientes grupos de tratamiento, 5 ratones en cada grupo: vehículo (PBS), 4 mg/kg de Ab 2 del control (anticuerpo del control que no muestra reactividad cruzada con el antígeno de CD20), 4 mg/kg de Ab 1, o 0.4 mg/kg de Ab 1. Todos los ratones se trataron por vía i.p. 2 veces por semana. Se sacrificaron los ratones cuando los tumores alcanzaron el volumen máximo de aproximadamente 1500 mm³. Como se demuestra en la FIG. 11B, el tratamiento con Ab 1 retrasó el crecimiento tumoral de los tumores ya establecidos, demostrando que los ratones CD3 humanizados son ventajosos para los estudios tempranos de fármacos candidatos.

30

35

Equivalentes

40

Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de discernir no utilizando más que la experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. Se pretende que tales equivalentes estén abarcados por las siguientes reivindicaciones.

45

Si un número de registro u otra cita se asocia con un contenido diferente en diferentes momentos, se entiende el contenido al efecto en la fecha de presentación eficaz de la solicitud, siendo la fecha de presentación eficaz la fecha de presentación de la solicitud de prioridad anterior que hace referencia a la cita, o si no hay ninguna, la fecha de presentación real.

50

A menos que resulte evidente de otro modo por el contexto, cualquier realización, aspecto, elemento, rasgo, etapa o similar se puede combinar con cualquier otra.

LISTADO DE SECUENCIAS

55

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Animales no humanos que expresan el complejo CD3 humanizado

<130> 7310P1

60

<150> 62/083.653

<151> 24/11/2014

<150> 62/106.999

65

<151> 23/01/2015

ES 2 844 000 T3

<160> 35

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
<211> 223
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Sintético

<400> 1

cgactttctt	gacttctatt	tgtaaacac	tgtgcattca	catcgaatgc	tagaagtttc	60
ctcgtcccgc	ttcctcctga	attgcctggg	atcctctgct	tgatgccctg	taggaaacgt	120
cctttcctgt	ggtatagaaa	tgactgctcg	agataacttc	gtataatgta	tgctatacga	180
agttatatgc	atggcctcgc	cgccggggtt	tggcgcctcc	cgc		223

<210> 2
<211> 224
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Sintético

25 <400> 2

tgatcttat	catgtctgga	ataacttcgt	ataatgatg	ctatacgaag	ttatgctagt	60
aactataacg	gtcctaaggt	agcgagctag	ccttccacag	acaccaatgt	tcaaaatgga	120
ggcttggggg	caaaattcct	ttgctatgtc	tctagtcgtc	caaaaaatgg	tcctaacttt	180
ttctgactcc	tgcttgtcaa	aaattgtggg	ctcatagtta	atgc		224

<210> 3
<211> 227
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Sintético

35 <400> 3

aggggagaat	ggccttcatg	cactccctcc	tcacctcag	cgccttgtgt	tttccttgct	60
tagtgatttc	ccctctcccc	accccacccc	ccacagtgtg	tgagaactgc	atggagatgg	120
atgtgatgtc	ggtggccata	atcatcattg	ttgacatctg	tatcactctg	ggcttgctga	180
tggtcattta	ttactggagc	aagaatagga	aggccaaggc	caagcct		227

40 <210> 4
<211> 220
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<223> Sintético

ES 2 844 000 T3

	<400> 4		
		gaaagagaga gtctttctgc taactaacc cagaaggcc ttccggtctc atgtcctgca	60
		aagcagtaga cgcccaaagc caggagcaga gttgcatga ggtcaatgaa gatgacacca	120
		gccacggtgg ctggatccag ctccacacag ctctggcaca ctgtggggga agggaggaga	180
		gaggagaggt tgagagcctt taagatcagg gaaccatcct	220
5	<210> 5 <211> 226 <212> ADN <213> Artificial		
10	<220> <223> Sintético		
	<400> 5		
		caagagagac agaagtcaca agaaaaagcc ttcagaaagt tccccaccaa ctgcaggggt	60
		caagggggac atgaggatgc cattcaagcg tgcacgagcg taggcagctt attgctctgc	120
		atacttacag accatttgtg tagtaagga catgatgccg agtgaaaggg gcaggagcaa	180
15		ccagagggag atttcaggaa gttctccagg gactcgaggt tctgta	226
	<210> 6 <211> 224 <212> ADN <213> Artificial		
20	<220> <223> Sintético		
25	<400> 6		
		gaagccccac ccagaaaggt aggacaaaga tcatagtcac atttacttca tccaggagag	60
		aaacacagac acagccattg ccttgccat catctctctc catcttgacc tcacgtgatc	120
		atggcgatcg cgagtgattt agtctacaat ccggaaaact aagtatagat actaccattt	180
		tcatggattt ggatctttct tcatcttggc ctcaaataac catg	224
30	<210> 7 <211> 216 <212> ADN <213> Artificial		
35	<220> <223> Sintético		
	<400> 7		
		gcattattgc agacaggcag gagaaaacga accaggaaaa acaactttcg caacctgaag	60
		gtttgtctct ccttttcct acagtgtgtc agaactgcat tgaactaaat gcagccacca	120
		tatctggctt tatcttcgct gaggtcatca gcatcttctt ccttgctctt ggtgtatct	180
40		tcattgcggg acaggatgga caataccctg tcttaa	216
	<210> 8 <211> 356		

ES 2 844 000 T3

	<212> ADN		
	<213> Artificial		
5	<220>		
	<223> Sintético		
	<400> 8		
	cgactttctt gacttctatt tgttaaacac tgtgcattca catcgaatgc tagaagtttc		60
	ctcgtcccgc ttctctctga attgcctggg atcctctgct tgatgccctg taggaaacgt		120
	cctttcctgt ggtatagaaa tgactgctcg agataacttc gtataatgta tgctatacga		180
	agttatgcta gtaactataa cggtcctaag gtagcgagct agccttccac agacaccaat		240
	gttcaaaatg gaggcttggg ggcaaaattc ttttgctatg tctctagtcg tccaaaaaat		300
	ggtcctaact ttttctgact cctgcttgtc aaaaattgtg ggctcatagt taatgc		356
10	<210> 9		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> Sintético		
	<400> 9		
20	cctctgccat gtaggttg gtac	24	
	<210> 10		
	<211> 27		
	<212> ADN		
25	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Sintético		
	<400> 10		
30	tgccgtgatg ttgttcaat gaccaa	27	
	<210> 11		
	<211> 25		
35	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Sintético		
	<400> 11		
40	gttctgagaa aggcgttct aagtg	25	
	<210> 12		
45	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
50	<223> Sintético		
	<400> 12		
	ccaggcgtac ttgctgtct g	21	
55	<210> 13		

ES 2 844 000 T3

	<211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
5	<220> <223> Sintético	
10	<400> 13 tgggcttacc atccaggacg a	21
15	<210> 14 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Sintético	
25	<400> 14 gctactcttc ccacaaactg ctag	25
30	<210> 15 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Sintético	
40	<400> 15 ccagcagtaa gttccactgt tctag	25
45	<210> 16 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Sintético	
55	<400> 16 tgtagaatg gctgtgacct agca	24
60	<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Sintético	
70	<400> 17 gggctgtgtt gcagtatgac	20
75	<210> 18 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
80	<220> <223> Sintético	
85	<400> 18 accgtgcaag tcattatcg aag	23
90	<210> 19	

ES 2 844 000 T3

	<211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
5	<220> <223> Sintético	
10	<400> 19 acgtgctcc tgaacccttt gggt	24
15	<210> 20 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Sintético	
20	<400> 20 tctcacatcc agaagcccta tc	22
25	<210> 21 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Sintético	
30	<400> 21 cgagggatgt atcagtgtaa agga	24
35	<210> 22 <211> 29 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Sintético	
40	<400> 22 cacagaacaa gtcaaaacca ctccaagtg	29
45	<210> 23 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Sintético	
55	<400> 23 gctcaccaga acagcaaata ctg	23
55	<210> 24 <211> 207 <212> PRT <213> Artificial	
60	<220> <223> proteína quimérica	
	<400> 24	

ES 2 844 000 T3

Met Arg Trp Asn Thr Phe Trp Gly Ile Leu Cys Leu Ser Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
 20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
 35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
 50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
 65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
 85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
 100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
 115 120 125

Ser Val Ala Ile Ile Ile Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Leu Gly Leu
 130 135 140

Leu Met Val Ile Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
 145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Thr Gly Ala Gly Ser Arg Pro Arg Gly Gln Asn
 165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
 180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Ala Val
 195 200 205

5 <210> 25
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> proteína química

<400> 25

ES 2 844 000 T3

Met Glu His Ser Gly Ile Leu Ala Ser Leu Ile Leu Ile Ala Val Leu
 1 5 10 15

Pro Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg
 20 25 30

Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
 35 40 45

Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile
 50 55 60

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys
 65 70 75 80

Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys
 85 90 95

Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Ala Gly Val Ile Phe Ile Asp Leu
 100 105 110

Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Tyr Cys Phe Ala Gly His
 115 120 125

Glu Thr Gly Arg Pro Ser Gly Ala Ala Glu Val Gln Ala Leu Leu Lys
 130 135 140

Asn Glu Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Glu Asp Thr Gln Tyr
 145 150 155 160

Ser Arg Leu Gly Gly Asn Trp Pro Arg Asn Lys Lys Ser
 165 170

5 <210> 26
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> proteína quimérica

<400> 26

ES 2 844 000 T3

Met Glu Gln Arg Lys Gly Leu Ala Gly Leu Phe Leu Val Ile Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys
 20 25 30

Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala
 35 40 45

Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe
 50 55 60

Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp
 65 70 75 80

Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro
 85 90 95

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala
 100 105 110

Ala Thr Ile Ser Gly Phe Ile Phe Ala Glu Val Ile Ser Ile Phe Phe
 115 120 125

Leu Ala Leu Gly Val Tyr Leu Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln
 130 135 140

Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Gln Asn Glu Gln Leu Tyr
 145 150 155 160

Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Tyr Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly
 165 170 175

Asn Gln Leu Arg Lys Lys
 180

5 <210> 27
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 27

ES 2 844 000 T3

Met Arg Trp Asn Thr Phe Trp Gly Ile Leu Cys Leu Ser Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Val Gly Thr Cys Gln Asp Asp Ala Glu Asn Ile Glu Tyr Lys Val Ser
 20 25 30

Ile Ser Gly Thr Ser Val Glu Leu Thr Cys Pro Leu Asp Ser Asp Glu
 35 40 45

Asn Leu Lys Trp Glu Lys Asn Gly Gln Glu Leu Pro Gln Lys His Asp
 50 55 60

Lys His Leu Val Leu Gln Asp Phe Ser Glu Val Glu Asp Ser Gly Tyr
 65 70 75 80

Tyr Val Cys Tyr Thr Pro Ala Ser Asn Lys Asn Thr Tyr Leu Tyr Leu
 85 90 95

Lys Ala Arg Val Cys Glu Tyr Cys Val Glu Val Asp Leu Thr Ala Val
 100 105 110

Ala Ile Ile Ile Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Leu Gly Leu Leu Met
 115 120 125

Val Ile Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val
 130 135 140

Thr Arg Gly Thr Gly Ala Gly Ser Arg Pro Arg Gly Gln Asn Lys Glu
 145 150 155 160

Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly
 165 170 175

Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Ala Val
 180 185

5 <210> 28
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 28

ES 2 844 000 T3

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
 1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
 20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
 35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
 50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
 65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
 85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
 100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
 115 120 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
 130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
 145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
 165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
 180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
 195 200 205

5 <210> 29
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 29

ES 2 844 000 T3

Met Glu His Ser Gly Ile Leu Ala Ser Leu Ile Leu Ile Ala Val Leu
 1 5 10 15

Pro Gln Gly Ser Pro Phe Lys Ile Gln Val Thr Glu Tyr Glu Asp Lys
 20 25 30

Val Phe Val Thr Cys Asn Thr Ser Val Met His Leu Asp Gly Thr Val
 35 40 45

Glu Gly Trp Phe Ala Lys Asn Lys Thr Leu Asn Leu Gly Lys Gly Val
 50 55 60

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Leu Cys Asn Gly Thr Glu Gln Leu Ala
 65 70 75 80

Lys Val Val Ser Ser Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys
 85 90 95

Val Glu Leu Asp Ser Gly Thr Met Ala Gly Val Ile Phe Ile Asp Leu
 100 105 110

Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Tyr Cys Phe Ala Gly His
 115 120 125

Glu Thr Gly Arg Pro Ser Gly Ala Ala Glu Val Gln Ala Leu Leu Lys
 130 135 140

Asn Glu Gln Leu Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Glu Asp Thr Gln Tyr
 145 150 155 160

Ser Arg Leu Gly Gly Asn Trp Pro Arg Asn Lys Lys Ser
 165 170

<210> 30
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 30

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu

5

10

ES 2 844 000 T3

Met Glu Gln Arg Lys Gly Leu Ala Gly Leu Phe Leu Val Ile Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Gln Gly Thr Val Ala Gln Thr Asn Lys Ala Lys Asn Leu Val Gln
 20 25 30

Val Asp Gly Ser Arg Gly Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Gly Leu
 35 40 45

Thr Asp Lys Thr Ile Lys Trp Leu Lys Asp Gly Ser Ile Ile Ser Pro
 50 55 60

Leu Asn Ala Thr Lys Asn Thr Trp Asn Leu Gly Asn Asn Ala Lys Asp
 65 70 75 80

Pro Arg Gly Thr Tyr Gln Cys Gln Gly Ala Lys Glu Thr Ser Asn Pro
 85 90 95

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Glu Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ile
 100 105 110

Gly Thr Ile Ser Gly Phe Ile Phe Ala Glu Val Ile Ser Ile Phe Phe
 115 120 125

Leu Ala Leu Gly Val Tyr Leu Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln
 130 135 140

Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Gln Asn Glu Gln Leu Tyr
 145 150 155 160

Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Tyr Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly
 165 170 175

Asn Gln Leu Arg Lys Lys
 180

5 <210> 32
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 32

ES 2 844 000 T3

Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu
 1 5 10 15

Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys
 20 25 30

Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala
 35 40 45

Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe
 50 55 60

Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp
 65 70 75 80

Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro
 85 90 95

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala
 100 105 110

Ala Thr Ile Ser Gly Phe Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val
 115 120 125

Leu Ala Val Gly Val Tyr Phe Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln
 130 135 140

Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr
 145 150 155 160

Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly
 165 170 175

Asn Gln Leu Arg Arg Asn
 180

5 <210> 33
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 33

ES 2 844 000 T3

Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln
1 5 10 15

Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys
20 25 30

Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn
35 40 45

Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His
50 55 60

Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val
65 70 75 80

Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr
85 90 95

Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met Ser
100 105 110

Val

<210> 34
<211> 87
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 34

Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe
1 5 10 15

Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val Gly Thr
20 25 30

Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp
35 40 45

Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys Asp Lys
50 55 60

Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys Val Glu
65 70 75 80

Leu Asp Pro Ala Thr Val Ala
85

10

<210> 35
<211> 97

ES 2 844 000 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 35

5

Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys Val Tyr Asp
1 5 10 15

Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala Glu Ala Lys
20 25 30

Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe Leu Thr Glu
35 40 45

Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp Pro Arg Gly
50 55 60

Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro Leu Gln Val
65 70 75 80

Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala Ala Thr Ile
85 90 95

Ser

REIVINDICACIONES

1. Un ratón genéticamente modificado, que comprende
 5 en un locus CD3 ϵ endógeno de ratón, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CD3 ϵ quimérica humana/ratón que comprende un dominio extracelular de una proteína CD3 ϵ humana unida operativamente a los dominios transmembrana y citoplásmico de CD3 ϵ de ratón,
 en un locus CD3 δ endógeno de ratón, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CD3 δ quimérica humana/ratón que comprende un dominio extracelular de CD3 δ humana unido operativamente a los dominios transmembrana y citoplásmico de CD3 δ de ratón, y
 10 en un locus CD3 γ endógeno de ratón, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CD3 γ quimérica humana/ratón que comprende un dominio extracelular de CD3 γ humana unido operativamente a los dominios transmembrana y citoplásmico de CD3 γ de ratón,
 en donde el ratón expresa sobre la superficie de sus linfocitos T un complejo CD3 humanizado funcional que comprende las proteínas CD3 ϵ , CD3 δ y CD3 γ quiméricas humanas/ratón y en donde los loci CD3 ϵ , CD3 δ y CD3 γ endógenos de ratón están modificados genéticamente para no expresar dominios extracelulares funcionales de las proteínas CD3 ϵ , CD3 δ y CD3 γ endógenas de ratón.
2. Un embriocitoblasto (ES) de ratón genéticamente modificado que comprende
 20 en un locus CD3 ϵ endógeno de ratón, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CD3 ϵ quimérica humana/ratón que comprende un dominio extracelular de una proteína CD3 ϵ humana unida operativamente a los dominios transmembrana y citoplásmico de CD3 ϵ de ratón,
 en un locus CD3 δ endógeno de ratón, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CD3 δ quimérica humana/ratón que comprende un dominio extracelular de CD3 δ humana unido operativamente a los dominios transmembrana y citoplásmico de CD3 δ de ratón, y
 25 en un locus CD3 γ endógeno de ratón, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CD3 γ quimérica humana/ratón que comprende un dominio extracelular de CD3 γ humana unido operativamente a los dominios transmembrana y citoplásmico de CD3 γ de ratón.
3. El ratón de la reivindicación 1 o la célula ES de ratón de la reivindicación 2,
 30 en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína CD3 ϵ quimérica sustituye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína CD3 ϵ endógena de ratón correspondiente,
 en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína CD3 δ quimérica sustituye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína CD3 δ endógena de ratón correspondiente, y
 35 en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína CD3 γ quimérica sustituye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína CD3 γ endógena de ratón correspondiente.
4. El ratón o la célula ES de ratón de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el dominio extracelular de la proteína CD3 ϵ humana comprende la secuencia de SEQ ID NO: 33, el dominio extracelular de la proteína CD3 δ humana comprende la secuencia de SEQ ID NO: 34, y el dominio extracelular de la proteína CD3 γ humana comprende la secuencia de SEQ ID NO: 35.
5. El ratón o la célula ES de ratón de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es heterocigótico para los loci CD3 endógenos de ratón modificados.
- 45 6. El ratón o la célula ES de ratón de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que es homocigótico para los loci CD3 endógenos de ratón modificados.
7. Un método para generar un ratón genéticamente modificado como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:
 50 a) introducir en el genoma de embriocitoblasto del ratón (ES)
 en un locus CD3 ϵ endógeno de ratón, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CD3 ϵ quimérica humana/ratón que comprende un dominio extracelular de CD3 ϵ humana unido operativamente a los dominios transmembrana y citoplásmico de CD3 ϵ de ratón,
 55 en un locus CD3 δ endógeno de ratón, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CD3 δ quimérica humana/ratón que comprende un dominio extracelular de CD3 δ humana unido operativamente a los dominios transmembrana y citoplásmico de CD3 δ de ratón, y
 en un locus CD3 γ endógeno de ratón, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CD3 γ quimérica humana/ratón que comprende un dominio extracelular de CD3 γ humana unido operativamente a los dominios transmembrana y citoplásmico de CD3 γ de ratón; y
 60 b) generar el ratón genéticamente modificado a partir de la célula, opcionalmente, en donde la célula es una célula ES individual, y la célula ES individual se introduce en un embrión de ratón para generar un ratón.
- 65 8. Un método para generar una célula ES de ratón genéticamente modificada como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2-6, que comprende:

- introducir en el genoma de la célula ES
 en un locus CD3ε endógeno de ratón, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CD3ε quimérica humana/ratón que comprende un dominio extracelular de CD3ε humana unido operativamente a los dominios transmembrana y citoplásmico de CD3ε de ratón,
 5 en un locus CD3δ endógeno de ratón, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CD3δ quimérica humana/ratón que comprende un dominio extracelular de CD3δ humana unido operativamente a los dominios transmembrana y citoplásmico de CD3δ de ratón, y
 en un locus CD3γ endógeno de ratón, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CD3γ quimérica humana/ratón que comprende un dominio extracelular de CD3γ humana unido operativamente a los dominios transmembrana y citoplásmico de CD3γ de ratón.
 10
9. El método de las reivindicaciones 7 u 8,
 en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína CD3ε quimérica sustituye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína CD3ε endógena de ratón correspondiente,
 15 en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína CD3δ quimérica sustituye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína CD3δ endógena de ratón correspondiente, y
 en donde la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína CD3γ quimérica sustituye la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína CD3γ endógena de ratón correspondiente.
 20
10. Un modelo de ratón para ensayar una proteína de unión a antígeno biespecífica basada en CD3, en donde la proteína de unión a antígeno tiene capacidad de unión a CD3 y a un antígeno no de ratón de interés, que comprende:
 25 a) un ratón cuyo genoma está genéticamente modificado de tal manera que expresa sobre la superficie de sus linfocitos T un complejo CD3 humanizado funcional que comprende las proteínas CD3ε, CD3δ y CD3γ quiméricas humanas/ratón,
 en donde la proteína CD3ε quimérica humana/ratón comprende un dominio extracelular de una proteína CD3ε humana unido operativamente a los dominios transmembrana y citoplásmico de una proteína CD3ε de ratón,
 en donde la proteína CD3δ quimérica humana/ratón comprende un dominio extracelular de una proteína CD3δ humana unido operativamente a los dominios transmembrana y citoplásmico de una proteína CD3δ de ratón, y
 30 en donde la proteína CD3γ quimérica humana/ratón comprende un dominio extracelular de una proteína CD3γ humana unido operativamente a los dominios transmembrana y citoplásmico de una proteína CD3γ de ratón, y
 b) una célula que expresa o comprende el antígeno no de ratón de interés, opcionalmente, en donde el antígeno de interés es un antígeno humano de interés.
 35
11. Un método para cribar una proteína de unión a antígeno que se une a CD3 humana y un antígeno de interés, comprendiendo el método:
 40 a. Introducir el antígeno de interés en un ratón genéticamente modificado como se define en una de las reivindicaciones 1 y 3-6 o generado de acuerdo con el método de las reivindicaciones 7 o 9,
 b. poner en contacto el ratón con una proteína de unión a antígeno, y
 c. determinar si la proteína de unión a antígeno es eficaz en la activación de linfocitos T de ratón que expresan el complejo CD3 funcional.
- 45 12. El método de la reivindicación 11, en donde la etapa de introducción comprende modificar genéticamente el ratón para expresar el antígeno de interés; infectar el ratón con el antígeno de interés, llevar a cabo opcionalmente la infección vírica o bacteriana; y/o introducir en dicho ratón una célula que expresa el antígeno de interés.
- 50 13. El modelo de ratón o el método de las reivindicaciones 10 o 12, en donde la célula es una célula tumoral o una célula bacteriana.
14. El modelo de ratón o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en donde el ratón es un ratón inmunocompetente.
- 55 15. El modelo de ratón o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 10-14, en donde el antígeno de interés es
 60 (a) un antígeno asociado a tumor, que se puede seleccionar opcionalmente entre el grupo que consiste en ALK, proteínas BAGE, BIRC5 (survivina), BIRC7, CA9, CALR, CCR5, CD19, CD20 (MS4A1), CD22, CD27, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44, CD52, CD56, CD79, CDK4, CEACAM3, CEACAM5, CLEC12A, EGFR, EGFR variante III, ERBB2 (HER2), ERBB3, ERBB4, EPCAM, EPHA2, EPHA3, FCRL5, FLT3, FOLR1, proteínas GAGE, GD2, GD3, GPNMB, GM3, GPR112, IL3RA, KIT, KRAS, LGR5, LMP2 derivada de VEB, L1CAM, proteínas MAGE, MLANA, MSLN, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, MUC16, MUM1, ANKRD30A, NY-ESO1 (CTAG1B), OX40, PAP, PAX3, PAX5, PLAC1, PRLR, PMEL, PRAME, PSMA (FOLH1), proteínas RAGE, RET, RGS5, ROR1, SART1, SART3, SLAMF7, SLC39A6 (LIV1), STEAP1, STEAP2, TERT, TMPRSS2, nuevo antígeno de Thompson, TNFRSF17, TYR, UPK3A, VTCN1 y WT1 humana,
 65

- 5 (b) un antígeno de una enfermedad infecciosa, que opcionalmente puede ser un antígeno vírico, tal como VIH; hepatitis A; hepatitis B; hepatitis C; virus del herpes tal como VHS-1, VHS-2, CMV, VHA-6, VVZ y virus de Epstein-Barr; adenovirus; virus de la gripe; flavivirus; ecovirus; rinovirus; virus coxsackie; coronavirus; virus respiratorio sincitial; virus de las paperas; rotavirus; virus del sarampión; virus de la rubeola; parvovirus; virus vaccinia; HTLV; virus del dengue; virus del papiloma; virus de molusco; poliovirus; virus de la rabia; virus JC; virus del ébola; y antígeno vírico de la encefalitis arbovítica; o
- 10 (c) un antígeno bacteriano, que opcionalmente puede ser clamidia, rickettsia, micobacterias, estafilococos, estreptococos, neumonococos, meningococos, gonococos, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionella, difteria, salmonela, bacilos, cólera, tétanos, botulismo, ántrax, peste, leptospira, y antígeno bacteriano de la enfermedad de Lyme.
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en donde la proteína de unión a antígeno es
- 15 a) un anticuerpo, un anticuerpo biespecífico o una proteína de unión a antígeno biespecífica, y/o
b) es capaz de reconocer una proteína CD3 de mono.
17. El método de la reivindicación 13, en donde la proteína de unión a antígeno es
- 20 a) capaz de reducir, eliminar o prevenir el crecimiento tumoral en comparación con un agente que no se dirige al antígeno de interés y en donde la etapa de determinar opcionalmente comprende un ensayo del volumen tumoral o un ensayo de destrucción de células tumorales mediado por linfocitos T, o
b) capaz de reducir, eliminar o prevenir una infección bacteriana o vírica en comparación con un agente que no se dirige al antígeno de interés y en donde la etapa de determinar opcionalmente comprende la medición de los títulos víricos o bacterianos.

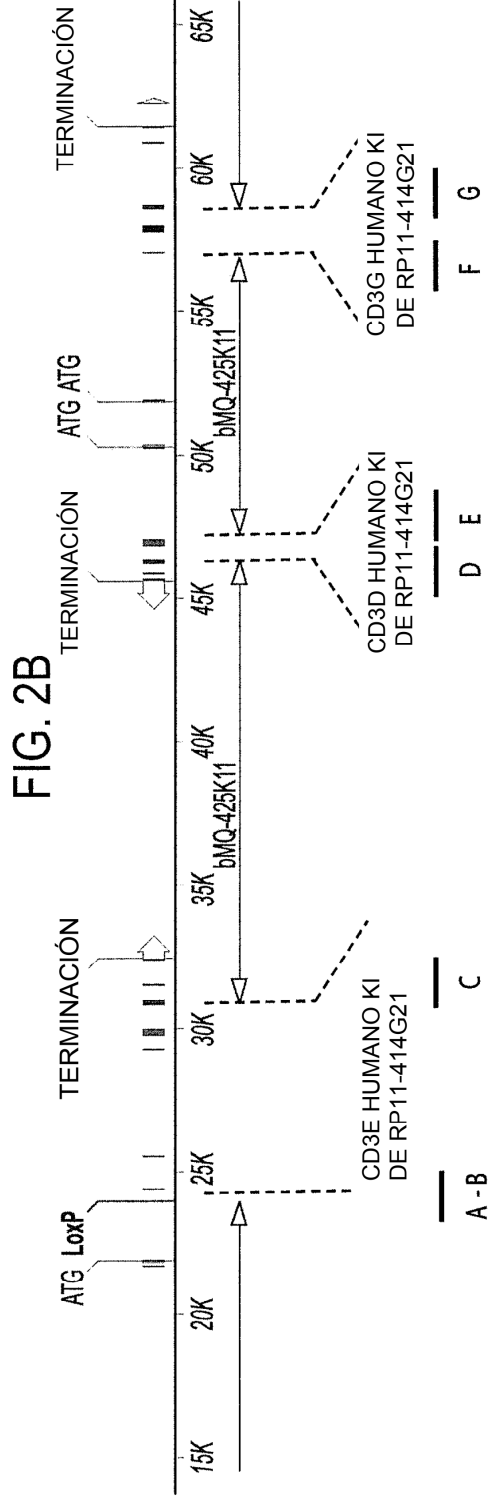
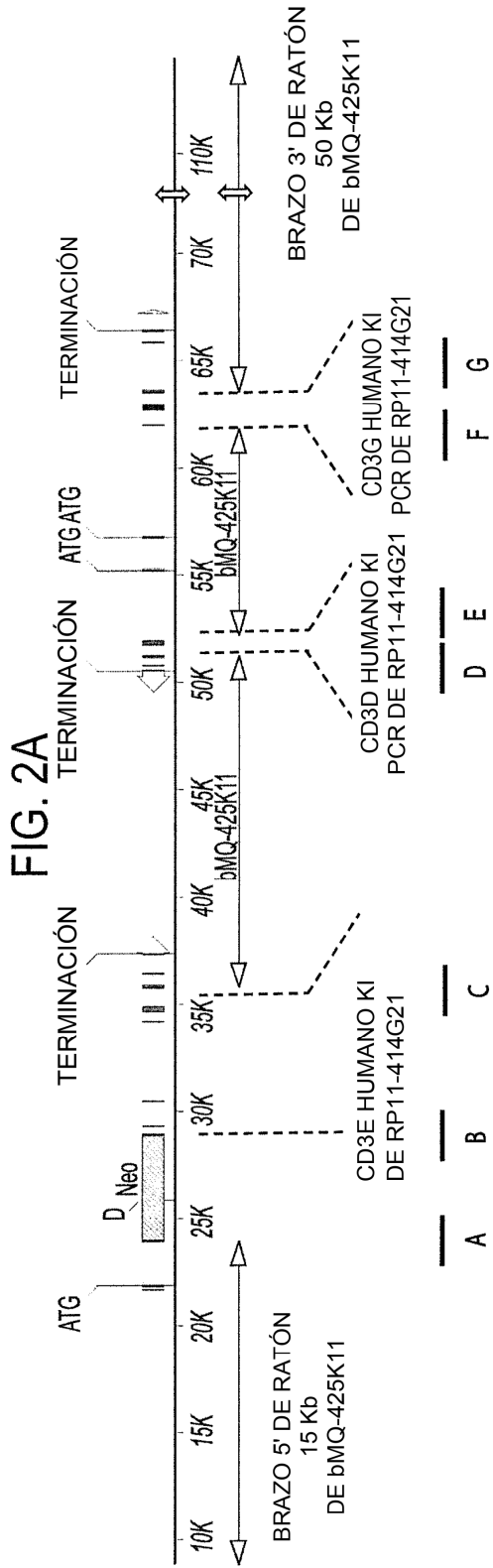


FIG. 3

Proteína CD3e humanizada

(SEQ ID NO: 24)

MRWNTFWGILCLSLAVGVWGQDNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPO
YPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYVCYPRGSK
PEDANFYLRARVCENCMEMDVMSVAIIIVDICITLGLLMVIYWSKNRKAK
 AKPVTRGTGAGSRPRGQNKERPPVPNPDYEPYRKGQRDLYSGLNQRAV*

Proteína CD3d humanizada

(SEQ ID NO:25)

MEHSGILASLILIAVLPOVSPFKIPIEELEDVFNVCNTSITWVEGTVGTLSDITRL
DLGKRILDPRGIRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGVIFIDLIA
 TLLALGVYCFAGHETGRPSGAAEVQALLKNEQLYQPLRDREDTQYSRLGGNWP
 RNKKS*

Proteína CD3g humanizada

(SEQ ID NO:26)

MEQRKGLAGLFLVISLLQGTLAQSIKNHLVKVDYQEDGSVLLCDAEAKNIT
 WFKDGKMIGFLTEDKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYRMC
QNCIELNAATISGFIFAEVISIFFLALGVILAGQDGVRQSRASDKQTLLQNEQLY
 QPLKDREYDQYSHLQGNQLRKK*

Los restos subrayados se han codificado mediante la introducción de exones humanos

FIG. 5A

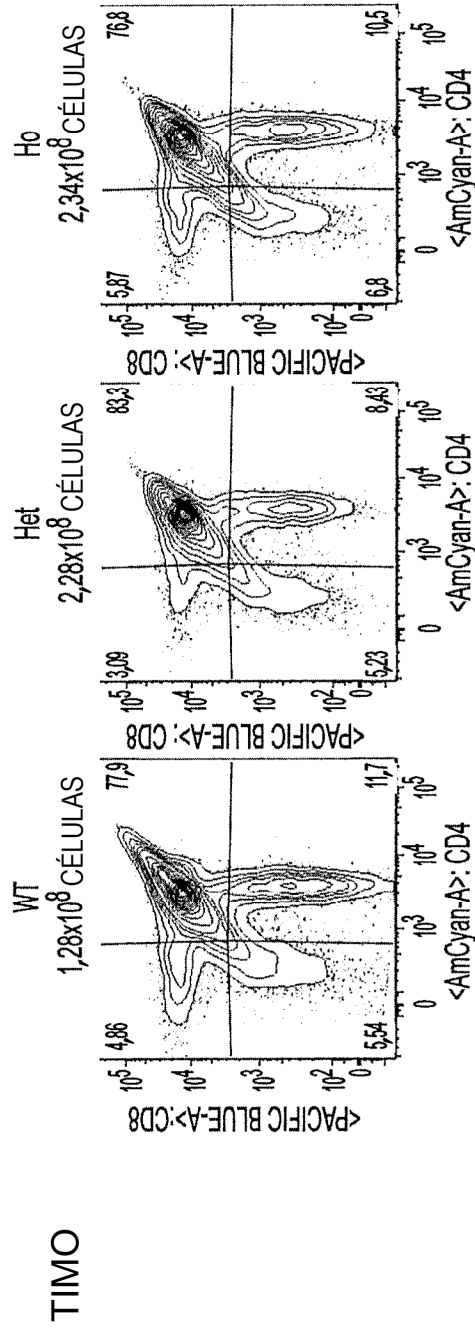


FIG. 5B

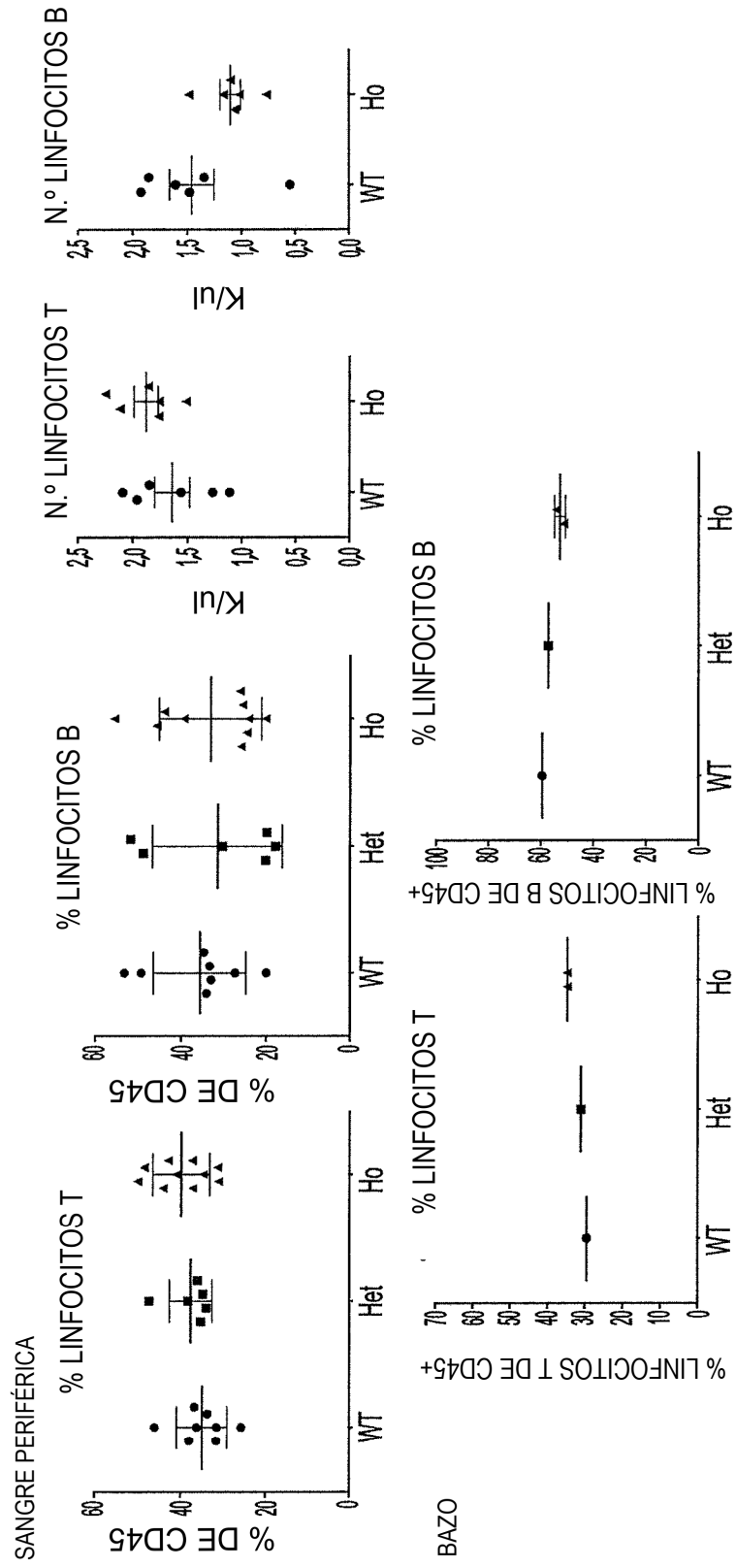
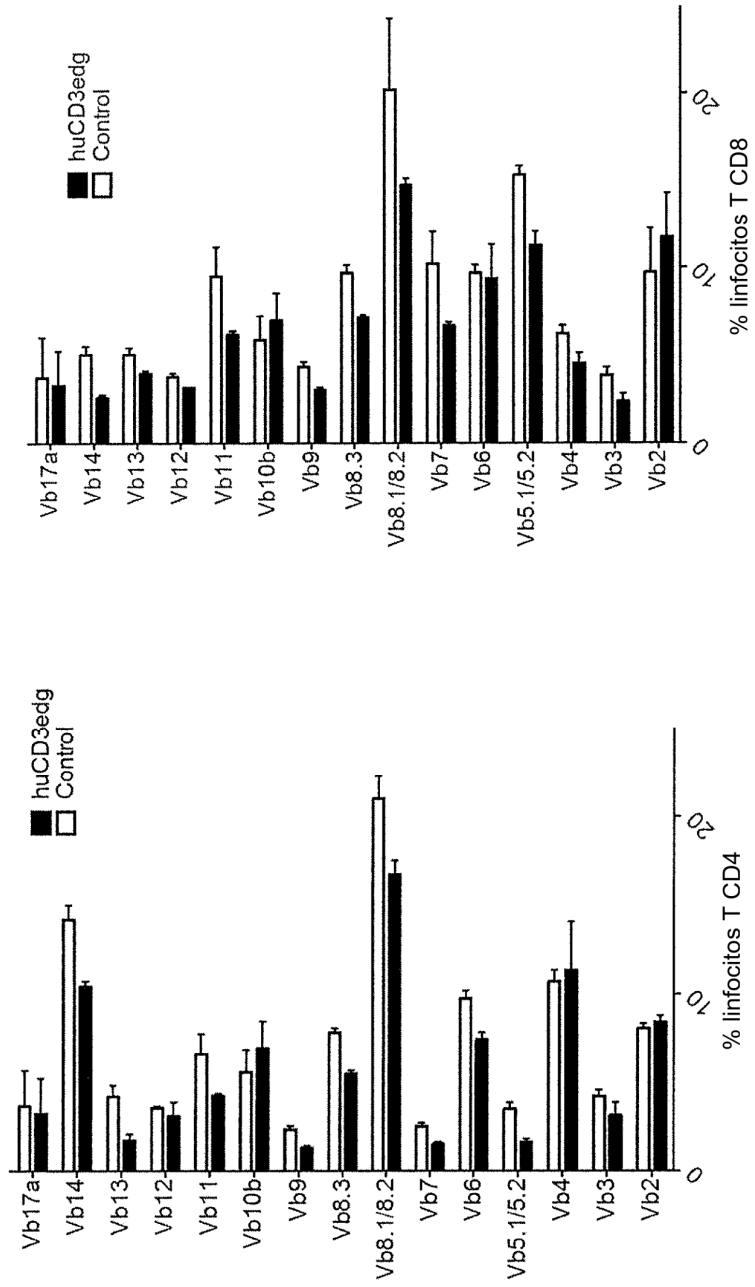


FIG. 5C



Ratones CD3 humanizados infectados con el clon 13 de LCMV con o sin infección previa de LCMV Armstrong
Títulos del bazo (uff/ml)

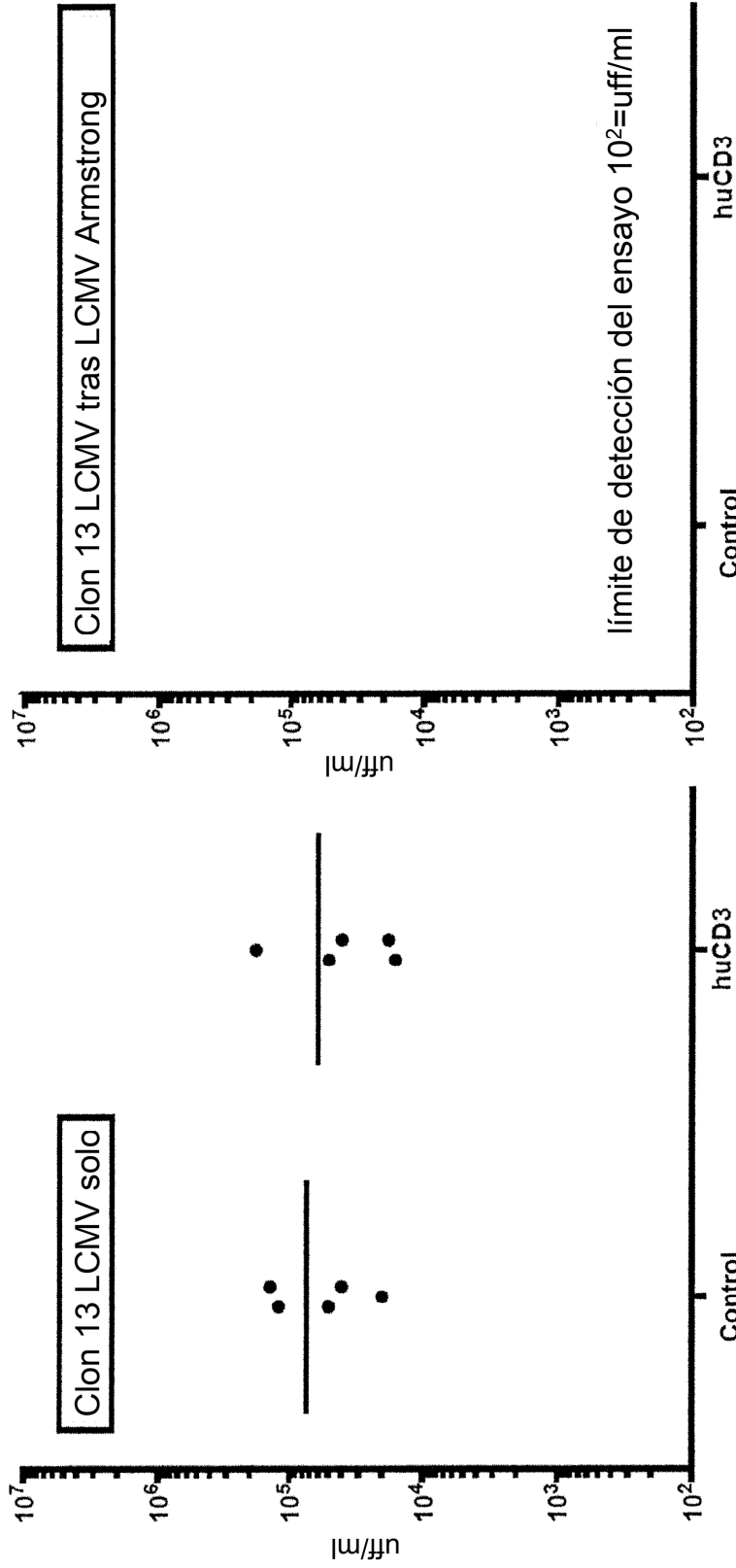
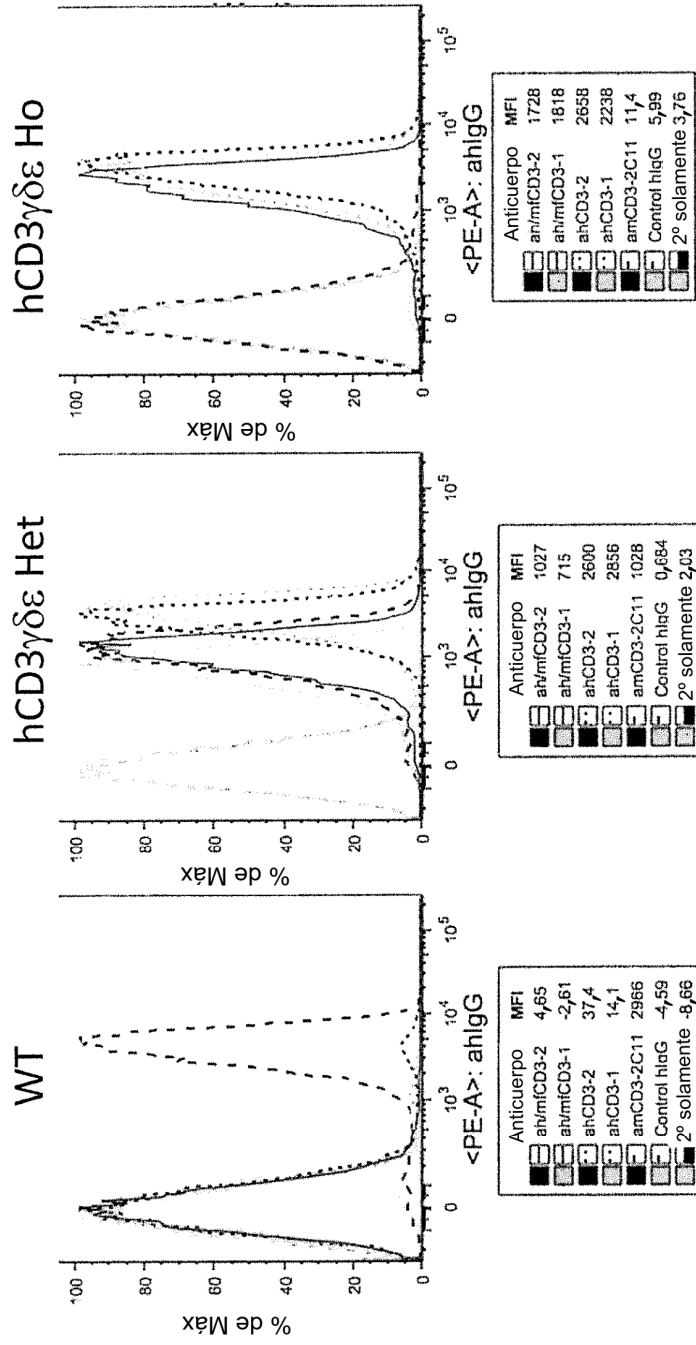


FIG. 6A

FIG. 6B

FIG. 7



- ah/mf = anticuerpos anti-CD3 humana que reaccionan en cruzado con CD3 de macaco
- ah = anticuerpos anti-CD3 humana que no reaccionan en cruzado con CD3 de macaco

FIG. 8A

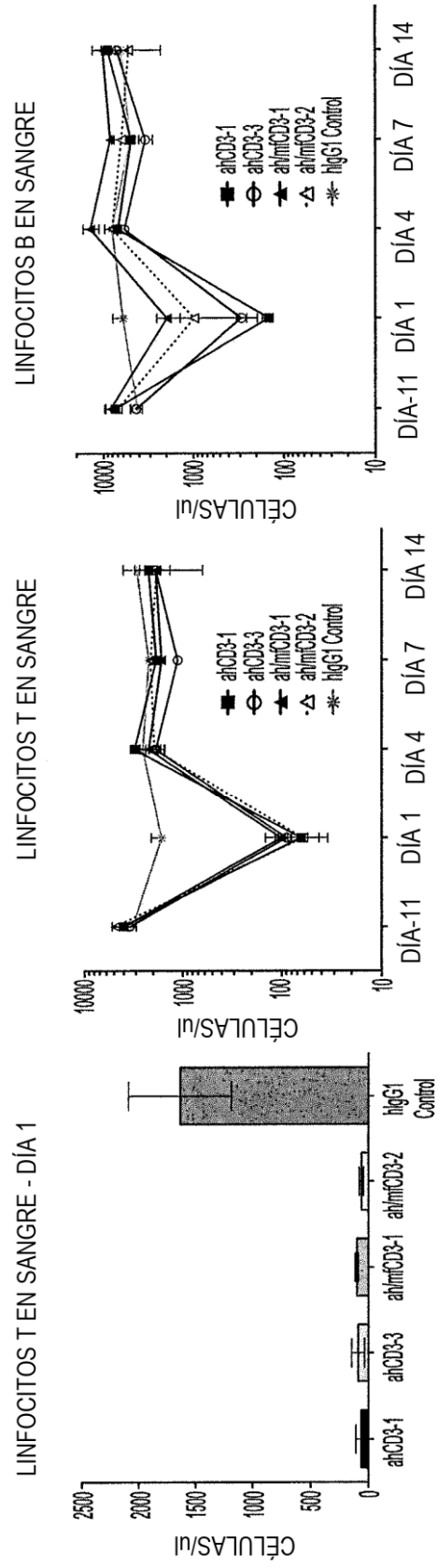


FIG. 8B

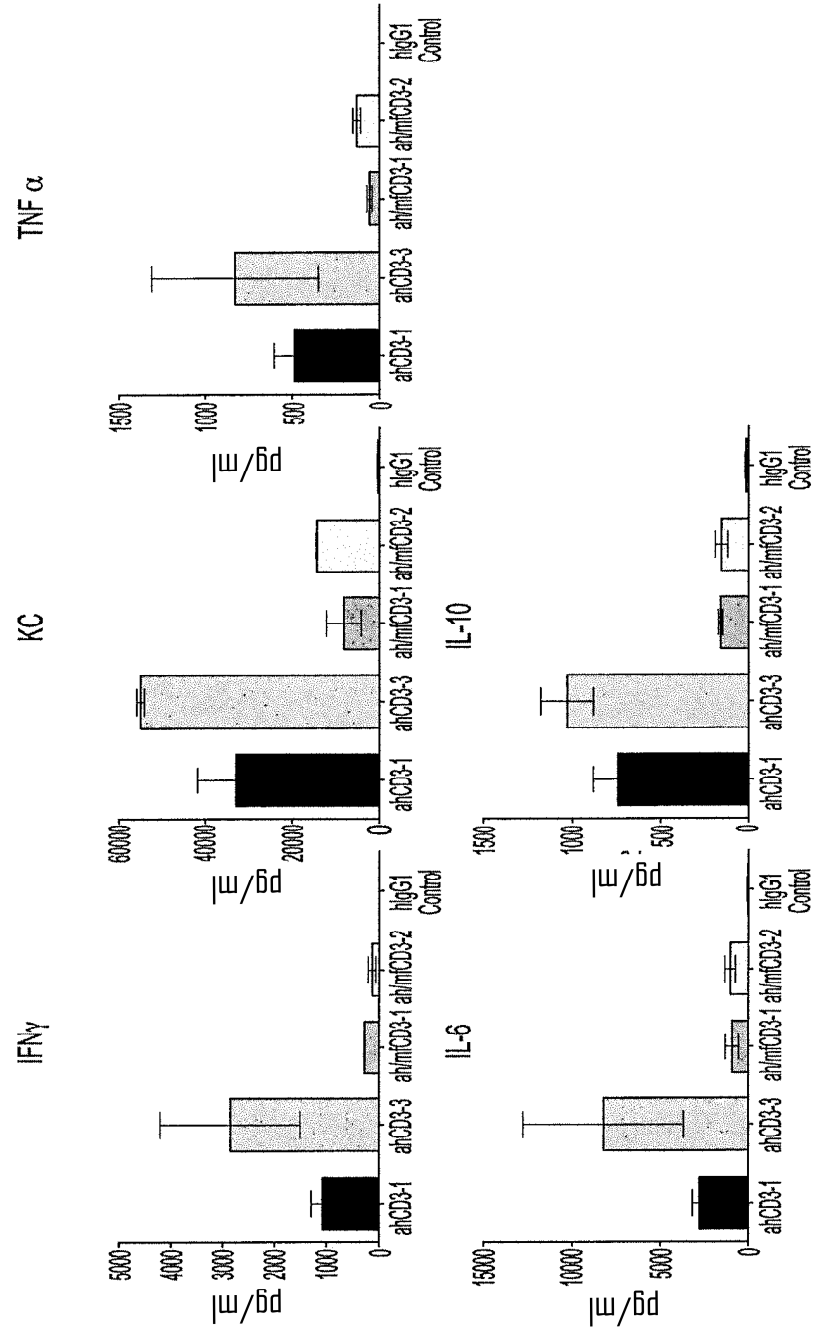


FIG. 9

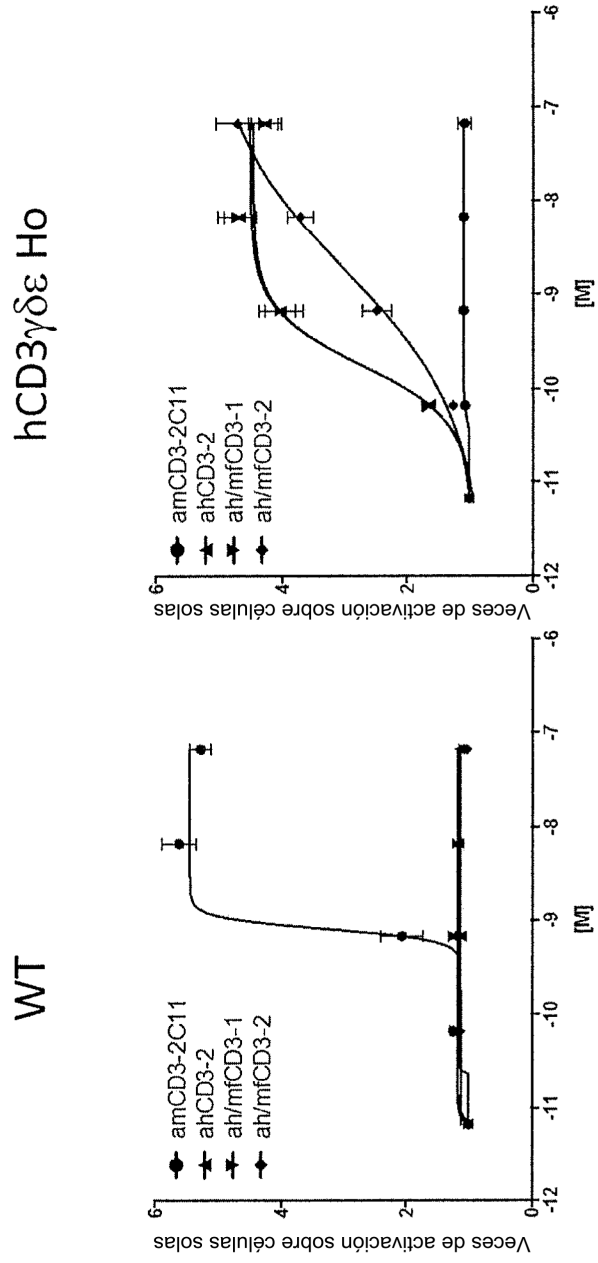
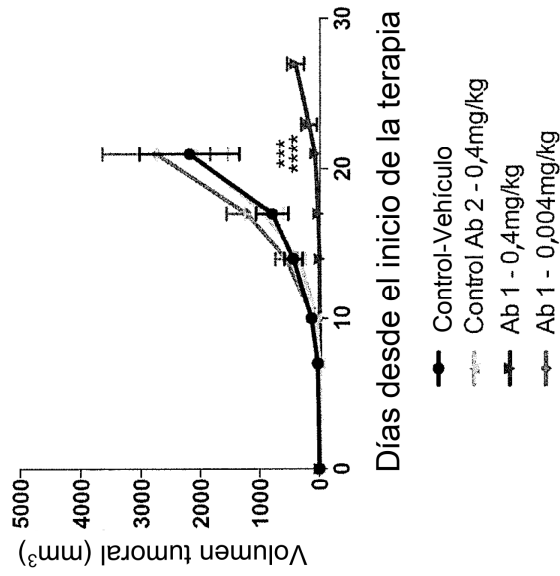


FIG. 10

Genotipo	ECD	Desarrollo linfocitos T	Responde a anti- mCD3	Se une a anti-hCD3	Responde a anti-hCD3
WT	Ratón	Normal	Si	No	No
hCD3gde- homocigoto	Humano	Normal	No	Si, todos los anticuerpos estudiados, incluidos los de macaco, reaccionan en cruzado con anticuerpos	Si, todos los anticuerpos estudiados, incluidos los de macaco, reaccionan en cruzado con anticuerpos

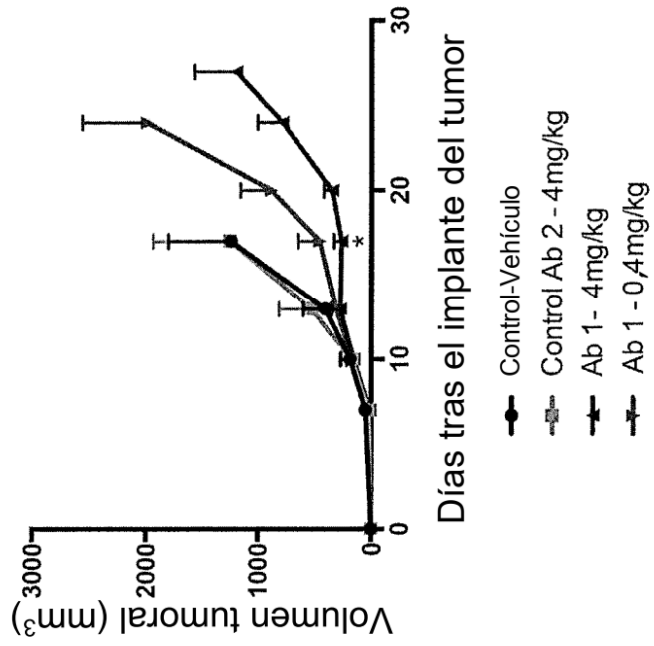
FIG. 11A



****-comparado con vehículo; ***- comparado con el control de Ab 2 control

Los datos representan los datos compuestos de n=5 ratones por grupo. Los datos se representan como media (SEM) y se analizaron usando análisis de varianza (ANOVA) y pruebas post-hoc para probar efectos significativos (Tukey para ANOVA bilateral)

FIG. 11B



*- comparado con el vehículo y el control de anticuerpo

Los datos representan los datos compuestos de n=5 ratones por grupo. Los datos se representan como media (SEM) y se analizaron usando análisis de varianza (ANOVA)