

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 978 496**

(51) Int. Cl.:

A01K 67/027 (2014.01)
A61P 37/02 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2010 E 21169074 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2024 EP 3888457**

(54) Título: **Modelos animales y moléculas terapéuticas**

(30) Prioridad:

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

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.09.2024

(73) Titular/es:

KYMBAB LIMITED (100.0%)
The Bennet Building (B930), Babraham Research Campus
Cambridge CB22 3AT, GB

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 978 496 T3

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

DESCRIPCIÓN

Modelos animales y moléculas terapéuticas

Antecedentes

5 La presente divulgación se refiere, entre otras cosas, a roedores y células que están modificados genéticamente para contener ADN exógeno, tal como ADN del gen de inmunoglobulina humana, su uso en medicina y el estudio de enfermedades, métodos para la producción de roedores y células, y anticuerpos y cadenas de anticuerpos producidos por tales roedores y sus derivados.

10 Para solucionar los problemas de los anticuerpos humanizantes, varias empresas se propusieron generar ratones con sistemas inmunológicos humanos. La estrategia utilizada fue inactivar los loci de las cadenas pesadas y ligeras en las células ES y complementar estas lesiones genéticas con transgenes diseñados para expresar los genes de las cadenas pesadas y ligeras humanas. Aunque se podrían generar anticuerpos totalmente humanos, estos modelos tienen varias limitaciones importantes:

15 (i) El tamaño de los loci de las cadenas pesadas y ligeras (cada uno de varias Mb) hizo imposible introducir los loci completos en estos modelos. Como resultado, las líneas transgénicas recuperadas tenían un repertorio muy limitado de regiones V, faltaban la mayoría de las regiones constantes y no se incluyeron en los transgenes importantes regiones potenciadoras distantes.

20 (ii) La muy baja eficiencia de generación de líneas transgénicas de insertos grandes y la complejidad y el tiempo requeridos para cruzar cada una de estas en las cepas inactivadas en las cadenas pesadas y ligeras y volverlas homocigotas nuevamente, restringieron el número de líneas transgénicas que podrían analizarse para expresión óptima.

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

El documento WO2007117410 divulga construcciones químéricas para expresar anticuerpos químéricos.

25 El documento WO2010039900 divulga células con inserción génica dirigida "knock-in" y mamíferos que tienen un genoma que codifica anticuerpos químéricos.

La presente divulgación proporciona, entre otras cosas, un procedimiento para la generación en roedores de anticuerpos que comprenden una región variable de Ig humana, y proporciona adicionalmente modelos de roedores para la generación de tales anticuerpos.

Compendio de la invención

30 La invención es la que se define en las reivindicaciones 1 a 12.

Cualquier referencia en el presente documento a mamíferos no humanos se refiere a roedores.

Las realizaciones dirigidas a métodos para la construcción de loci químéricos de cadenas pesadas y ligeras humanas en un mamífero no humano no están abarcadas por el texto de las reivindicaciones, pero se consideran útiles para comprender la invención.

35 Las realizaciones dirigidas a células *per se* no están abarcadas por el texto de las reivindicaciones, pero se consideran útiles para comprender la invención.

Figuras

Las Figuras 1 a 8 muestran un procedimiento iterativo para la inserción de una serie de BAC humanos en un locus de Ig de ratón

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

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

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

Las Figuras 22 a 26 divulgan un procedimiento iterativo alternativo para la inserción de una serie de BAC humanos en un locus de Ig de ratón.

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

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

5 La Figura 31 ilustra la integración RMCE secuencial en el Lugar de Emplazamiento Genómico.

La Figura 32 ilustra la confirmación de la inserción satisfactoria en el Lugar de Emplazamiento Genómico.

La Figura 33 ilustra la Confirmación por PCR del Curado del Extremo 3'.

La Figura 34 ilustra la inserción de BAC Núm.1 y el Diagnóstico por PCR.

Descripción general

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

En el presente documento se divulgan, pero no forman parte de la invención, métodos para la construcción de loci de cadenas pesadas y ligeras humanas químéricas en un roedor, por ejemplo, un ratón. La referencia al trabajo en ratones en el presente documento se indica solamente a modo de ejemplos, y se considera que la referencia a ratones incluye la referencia a todos los roedores, a menos que sea evidente de otra manera a partir de la divulgación, prefiriéndose los ratones como roedor.

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

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

(b) opcionalmente una o más regiones V de cadena ligera kappa de Ig humana y una o más regiones J de cadena ligera kappa de Ig humana aguas arriba de la región constante kappa de mamífero no humano anfitrión y/o una o más regiones V lambda de cadena ligera de Ig humana y una o más regiones J lambda de cadena ligera de Ig humana aguas arriba de la región constante lambda de mamífero no humano anfitrión; en donde el mamífero no humano es capaz de producir un repertorio de anticuerpos químéricos o cadenas de anticuerpos que tienen una región constante de mamífero no humano y una región variable humana.

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

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

(b) opcionalmente una o más regiones V de IgH humana, una o más regiones D humanas y una o más regiones J humanas aguas arriba de la región constante de mamífero no humano anfitrión; en donde el mamífero no humano es capaz de producir un repertorio de anticuerpos químicos que tienen una región constante de mamífero no humano y una región variable humana.

Opcionalmente, el genoma de mamífero no humano se modifica para evitar la expresión de anticuerpos totalmente específicos de la especie anfitriona.

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

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

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

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

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

Aunque el número de regiones VD y J es variable entre individuos humanos, en un aspecto se considera que hay 51 genes V humanos, 27 genes D y 6 J en la cadena pesada, 40 genes V humanos y 5 genes J en la cadena ligera kappa y 29 genes V humanos y 4 genes J en la cadena ligera lambda (Janeway y Travers, Immunobiology, tercera 15 edición).

En un aspecto, el locus de cadena pesada humana insertado en el mamífero no humano contiene el repertorio completo de regiones V, D y J humanas, que en el genoma están en ordenamiento funcional con las regiones constantes de roedor de manera que se pueden producir anticuerpos químéricos funcionales entre las regiones variables humanas y constantes de roedor. Este material genético de cadena pesada humana insertado total se 20 denomina en el presente documento región VDJ de IgH humana, y comprende ADN de un genoma humano que codifica todos los exones que codifican las porciones V, D y J humanas y adecuadamente también los intrones asociados. De manera similar, la referencia a las regiones V y J de la cadena ligera kappa de Ig humana en el presente documento se refiere al ADN humano que comprende todos los exones que codifican las regiones V y J y 25 adecuadamente también los intrones asociados del genoma humano. La referencia a las regiones V y J de la cadena ligera lambda de Ig humana en el presente documento se refiere al ADN humano que comprende todos los exones que codifican las regiones V y J y adecuadamente también los intrones asociados del genoma humano.

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

30 En un aspecto, los anticuerpos o cadenas de anticuerpos químéricos tienen una parte de una región constante del anfitrión suficiente para proporcionar una o más funciones efectoras observadas en anticuerpos de origen natural en un mamífero anfitrión, por ejemplo, que son capaces de interactuar con receptores Fc y/o unirse al complemento.

La referencia a un anticuerpo o cadena de anticuerpo químéricos que tienen una región constante de roedor anfitrión en el presente documento, por lo tanto, no se limita a la región constante completa, sino que también incluye 35 anticuerpos o cadenas químéricos que tienen toda la región constante del anfitrión, o una parte de la misma, suficiente para proporcionar una o más funciones efectoras. Esto también se aplica a roedores y células y métodos divulgados en el presente documento en los que el ADN de la región variable humana se puede insertar en el genoma del anfitrión de manera que forme una cadena de anticuerpo químérica con toda o parte de una región constante del anfitrión. En 40 un aspecto, la totalidad de una región constante del anfitrión está conectada operablemente al ADN de la región variable humana.

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

45 En un aspecto, la inserción del ADN humano, tal como la región VDJ humana, está dirigida a la región entre el exón J4 y el locus C en el locus IgH del genoma de ratón, y en un aspecto se inserta entre las coordenadas 114.667.090 y 114.665.190, adecuadamente en coordenada 114.667.091. En un aspecto, la inserción del ADN humano, tal como la VJ de la cadena ligera kappa humana, se dirige al cromosoma 6 de ratón entre las coordenadas 70.673.899 y 70.675.515, adecuadamente en la posición 70.674.734, o una posición equivalente en el locus lambda del ratón en el 50 cromosoma 16.

- En un aspecto, la región constante de mamífero no humano anfitrión para formar el anticuerpo quimérico puede estar en un locus cromosómico diferente (no endógeno). En este caso, el ADN humano insertado, tal como la región o regiones VDJ o VJ variables humanas, se puede insertar a continuación en el genoma no humano en un sitio que es distinto del de la región constante pesada o ligera de origen natural. La región constante nativa se puede insertar en el genoma, o duplicar dentro del genoma, en un locus cromosómico diferente a la posición nativa, de modo que esté en un ordenamiento funcional con la región variable humana de modo que los anticuerpos químéricos de la divulgación todavía puedan ser producidos.
- En un aspecto, el ADN humano se inserta en la región constante endógena de tipo salvaje del anfitrión ubicada en el locus de tipo salvaje entre la región constante del anfitrión y la región VDJ del anfitrión.
- La referencia a la ubicación de la región variable aguas arriba de la región constante de roedor significa que hay una ubicación relativa adecuada de las dos porciones de anticuerpo, variable y constante, para permitir que las regiones variable y constante formen un anticuerpo o una cadena de anticuerpo químéricos *in vivo* en el mamífero. Por lo tanto, el ADN humano insertado y la región constante del anfitrión están en ordenamiento funcional entre sí para la producción de anticuerpos o cadenas de anticuerpos.
- En un aspecto, el ADN humano insertado es capaz de expresarse con diferentes regiones constantes del anfitrión mediante cambio de isotipo. En un aspecto, el cambio de isotipo no requiere ni implica cambio en trans. La inserción del ADN de la región variable humana en el mismo cromosoma que la región constante del anfitrión relevante significa que no hay necesidad de cambio en trans para producir un cambio de isotipo.
- Como se explicó anteriormente, los loci transgénicos utilizados para los modelos de la técnica anterior eran de origen humano, por lo tanto, incluso en aquellos casos en los que los transgenes podían complementar el locus del ratón de modo que los ratones produjeran células B que produjeran anticuerpos completamente humanos, las afinidades de los anticuerpos individuales rara vez alcanzaron aquellas que podían obtenerse de animales intactos (no transgénicos). La razón principal de esto (además del repertorio y niveles de expresión descritos anteriormente) es el hecho de que los elementos de control del locus son humanos. Por tanto, los componentes de señalización, por ejemplo, para activar la hipermutación y la selección de anticuerpos de alta afinidad, se ven comprometidos.
- Por el contrario, en la presente divulgación, las regiones constantes del roedor anfitrión se mantienen y se prefiere que al menos un potenciador de mamífero no humano u otra secuencia de control, tal como una región de cambio, se mantengan en ordenamiento funcional con la región constante del roedor, de manera que el efecto del potenciador u otra secuencia de control, como se observa en el mamífero anfitrión, se ejerce total o parcialmente en el animal transgénico.
- Este enfoque anterior está diseñado para permitir que se muestre toda la diversidad del locus humano, para permitir los mismos altos niveles de expresión que se lograrían mediante secuencias de control de mamíferos no humanos, tales como los potenciadores, y es tal que la señalización en la célula B, por ejemplo, el cambio de isotipo utilizando sitios de recombinación de cambio, seguiría utilizando secuencias de mamíferos no humanos.
- Un mamífero que tuviera tal genoma produciría anticuerpos químéricos con regiones variables humanas y constantes de roedor, pero éstas podrían humanizarse fácilmente, por ejemplo, en una etapa de clonación. Por otra parte, se pudo evaluar la eficacia *in vivo* de estos anticuerpos químéricos en estos mismos animales.
- En un aspecto, la región VDJ de IgH humana insertada comprende, en la configuración de la línea germinal, todas las regiones V, D y J y secuencias intermedias de un ser humano.
- En un aspecto, se insertan 800-1000 kb de la región VDJ de IgH humana en el locus IgH de mamífero no humano, y en un aspecto se inserta un fragmento de 940, 950 o 960 kb. Adecuadamente, esto incluye las bases 105.400.051 a 106.368.585 del cromosoma 14 humano (todas las coordenadas se refieren a NCBI36 para el genoma humano, ENSEMBL Versión 54 y NCBIM37 para el genoma de ratón, con relación a la cepa de ratón C57BL/6J).
- En un aspecto, el fragmento de IgH humana insertado consiste en las bases 105.400.051 a 106.368.585 del cromosoma 14. En un aspecto, el ADN de cadena pesada humana insertado, tal como el ADN que consiste en las bases 105.400.051 a 106.368.585 del cromosoma 14, se inserta en el cromosoma 12 de ratón entre el extremo de la región J4 de ratón y la región E , adecuadamente entre las coordenadas 114.667.091 y 114.665.190, adecuadamente en la coordenada 114.667.091.

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

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

- 5 Todos los fragmentos humanos específicos descritos anteriormente pueden variar de longitud y pueden, por ejemplo, ser más largos o más cortos que los definidos anteriormente, tales como 500 bases, 1 KB, 2 K, 3 K, 4 K, 5 KB, 10 KB, 20 KB, 30 KB, 40 KB o 50 KB o más, que comprenden adecuadamente toda o parte de la región V(D)J humana, mientras que preferiblemente se conserva el requisito de que el inserto final comprenda material genético humano que codifica la región de cadena pesada y la región de cadena ligera completas, según corresponda, como se describió anteriormente.

En un aspecto, el extremo 5' del inserto humano descrito anteriormente tiene una mayor longitud. Cuando el inserto se genera de forma escalonada, el aumento de longitud es generalmente con respecto al clon aguas arriba (5').

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

- 15 En un aspecto, el mamífero no humano comprende parte de la región VJ de cadena ligera kappa humana como se divulga en el presente documento, pero no la región VJ de cadena ligera lambda humana.

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

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

- 25 En un aspecto, la divulgación se refiere a un mamífero no humano o célula, y a métodos para producir dicho mamífero o célula (célula y métodos que no forman parte de la invención reivindicada), como se describe en el presente documento, en donde el ADN humano insertado, tal como la región VDJ o las regiones V, J de cadena ligera de IgH humana se encuentran en un solo alelo y no en ambos alelos en el mamífero o célula. En este aspecto, un mamífero o una célula tienen el potencial de expresar tanto una cadena pesada o ligera de un anticuerpo endógeno del anfitrión como una cadena pesada o ligera químéricas.

- 30 En un aspecto adicional, el ADN humano insertado, tal como la región VDJ y/o regiones VJ de cadena ligera de IgH humana, se pueden insertar de manera que estén conectadas operablemente en el genoma con una región constante mu de un roedor tal como una secuencia de rata.

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

- 35 La conexión operable permite adecuadamente la producción de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que comprende la región variable humana.

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

- 40 Adecuadamente, las regiones VJ y C de cadena ligera son capaces de formar cadenas de anticuerpos in vivo capaces de reaccionar específicamente con un antígeno.

En un aspecto de la divulgación no hay ninguna secuencia codificante no humana en la región de cadena ligera insertada.

- 45 En tales aspectos, una región kappa humana, opcionalmente con una región lambda humana, se inserta en el genoma, combinada con la inserción de la región VDJ de cadena pesada o parte de la misma, aguas arriba de la región constante de cadena pesada del anfitrión como se divulga en el presente documento.

Así, la célula o mamífero no humano de la divulgación, que no forman parte de la invención, pueden comprender:

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

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

La célula o mamífero no humano de la divulgación, que no forman parte de la invención, pueden comprender

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

una o más regiones V de cadena ligera lambda de Ig humana y una o más regiones J de cadena ligera lambda de Ig humana aguas arriba de la región constante lambda de mamífero no humano anfitrión;

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

15 En un aspecto, las secuencias VJC del anfitrión mamífero no humano pueden inactivarse de alguna manera, mediante mutación o inversión, o mediante inserción del ADN de la región variable humana, o mediante cualquier otro medio.

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

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

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

25 En tal ubicación, las secuencias potenciadoras o de cambio del anfitrión son operativas in vivo con la secuencia o las secuencias de la región constante del anfitrión.

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

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

40 En un aspecto, la divulgación se refiere a un roedor que comprende un locus de cadena pesada o cadena ligera de inmunoglobulina que tiene ADN de 3 o más especies. Por ejemplo, el roedor puede comprender ADN de la región constante de la célula anfitriona, secuencias codificantes V, D o J humanas según las reivindicaciones y una o más regiones de ADN no humanas, no del anfitrión, que son capaces de controlar una región del locus de inmunoglobulina. tales como una secuencia de cambio, promotor o potenciador que son capaces de controlar la expresión o el cambio

45 de isotipo in vivo del ADN de Ig. En un aspecto, el roedor es un ratón y comprende adicionalmente ADN humano del locus de Ig humana y adicionalmente una secuencia de ADN que no es de ratón, tal como una secuencia de ADN de rata, capaz de regular el ADN de ratón o humano.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un roedor que comprende un locus de cadena pesada o cadena ligera de inmunoglobulina que tiene ADN de 2 o más genomas humanos diferentes. Por ejemplo, podría comprender secuencias V(D)J de cadena pesada de más de un genoma humano dentro de una cadena pesada o ligera, o ADN VDJ de cadena pesada de un genoma y secuencias VJ de cadena ligera de un genoma diferente.

5 En un aspecto, la divulgación se refiere a un roedor que comprende un locus de cadena pesada o cadena ligera de inmunoglobulina, o parte del mismo, que tiene ADN de 2 o más especies, donde una especie contribuye con una región no codificante tal como una región reguladora, y la otra especie codifica regiones tales como V, D, J o regiones constantes.

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

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

15 Adecuadamente, una secuencia codificante humana puede colocarse bajo el control de un promotor de mamífero no humano apropiado, lo que permite que el ADN humano se transcriba eficazmente en la célula animal no humana apropiada. En un aspecto, la región humana es una secuencia codificante de la región V humana, y una región V humana se coloca bajo el control de un promotor de mamífero no humano.

20 El reemplazo funcional del promotor humano u otras regiones de control por regiones promotoras o de control de mamíferos no humanos se puede llevar a cabo mediante el uso de modificación genética in vivo mediada por recombinación homóloga ("recombineering"), u otras tecnologías de ADN recombinante, para insertar una parte de la región de Ig humana (tal como una región V humana) en un vector (tal como un BAC) que contiene una región de Ig no humana. La modificación genética in vivo mediada por recombinación homóloga/técnica recombinante reemplaza adecuadamente una porción del ADN no humano (p. ej., de ratón) por la región de Ig humana y, por lo tanto, coloca la región de Ig humana bajo el control del promotor de mamífero no humano u otra región de control. Adecuadamente, 25 la región codificante humana para una región V humana reemplaza una secuencia codificante de la región V de ratón. Adecuadamente, la región codificante humana para una región D humana reemplaza una secuencia codificante de la región D de ratón. Adecuadamente, la región codificante humana para una región J humana reemplaza una secuencia codificante de la región J de ratón. De esta manera, las regiones V, D o J humanas pueden colocarse bajo el control de un promotor de mamífero no humano, tal como un promotor de ratón.

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

35 Alternativamente, es posible usar modificación genética in vivo mediada por recombinación homóloga u otras tecnologías de ADN recombinante para insertar un promotor de mamífero no humano (p. ej., de ratón) u otra región de control, tal como un promotor para una región V, en una región de Ig humana que contiene BAC. Después, la etapa de modificación genética in vivo mediada por recombinación homóloga coloca una porción de ADN humano bajo el control del promotor de ratón u otra región de control.

40 En un aspecto, el repertorio completo de fragmentos V, D o J en orientación de la línea germinal puede insertarse aguas arriba y en ordenamiento funcional con una región constante del anfitrión.

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

45 En un aspecto de la divulgación, el ADN de la región variable humana lambda puede insertarse aguas arriba del locus endógeno, o aguas abajo, o por supuesto en un cromosoma diferente al locus endógeno, e insertarse con o sin ADN de la región constante.

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

Así, en un aspecto la divulgación, que no está abarcada por el texto de las reivindicaciones, pero se considera útil para comprender la invención, puede referirse a una célula o mamífero no humano cuyo genoma comprende:

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

5 (b) una o más regiones V de cadena ligera kappa de Ig humana y una o más regiones J de cadena ligera kappa de Ig humana, y/o una o más regiones V de cadena ligera lambda de Ig humana y una o más regiones J de cadena ligera lambda de Ig humana; en donde el mamífero no humano es capaz de producir un repertorio de anticuerpos químéricos, o cadenas ligeras o pesadas químicas, que tienen una región constante de mamífero no humano y una región variable humana.

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

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

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

una o más regiones V de cadena ligera lambda de Ig humana y una o más regiones J de cadena ligera lambda de Ig humana aguas abajo de la región constante lambda de mamífero no humano anfitrión, opcionalmente en el que la región variable lambda humana puede insertarse aguas abajo del locus lambda endógeno del anfitrión en conexión operable con una región constante lambda humana, de manera que el mamífero no humano o célula pueden producir cadenas ligeras de anticuerpos completamente humanos y cadenas pesadas químicas.

20 El uso de los métodos descritos en el presente documento permite construir un locus de manera gradual mediante inserciones secuenciales y, por lo tanto, permite la inserción de ADN variable humano junto con ADN de región constante humano o no humano en cualquier ubicación adecuada en el genoma de una célula anfitriona no humana. Por ejemplo, los métodos de la divulgación se pueden usar para insertar ADN de la región variable de inmunoglobulina

25 humana junto con ADN de la región constante del genoma del anfitrión en cualquier parte del genoma de una célula anfitriona no humana, permitiendo que se produzca una cadena de anticuerpo químico a partir de un sitio diferente de la región pesada endógena. Cualquier construcción de ADN de cadena pesada o cadena ligera humana contemplada anteriormente se puede insertar en cualquier posición deseada en el genoma de una célula anfitriona de roedor usando las técnicas descritas en el presente documento. Por lo tanto, la presente divulgación también se refiere a roedores que tienen genomas que comprenden tales inserciones.

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

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

40 Generalmente, un aspecto de la divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, es una célula anfitriona de mamífero no humano susceptible de expresión de una secuencia codificante de V, D o J humana bajo el control de un promotor o una región de control del anfitrión, siendo la expresión capaz de producir un anticuerpo humanizado que tiene un dominio variable humano y una región constante de mamífero no humano.

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

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

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

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

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

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

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

15 La divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, también se refiere a una línea celular que se cultiva o se obtiene de otro modo a partir de células como se describe en el presente documento, incluida una línea celular inmortalizada. La línea celular puede comprender genes V, D o J humanos insertados como se describe en el presente documento, ya sea en la configuración de la línea germinal o después de un reordenamiento tras la maduración in vivo. La célula puede inmortalizarse mediante fusión con una célula tumoral para proporcionar una célula y una línea celular productoras de anticuerpos o puede prepararse mediante inmortalización celular directa.

20 La presente divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, también se refiere a vectores para su uso en la divulgación. En un aspecto, tales vectores son BAC (cromosomas artificiales bacterianos). Se apreciará que se pueden usar otros vectores de clonación en la divulgación y, por lo tanto, la referencia a BAC en el presente documento se puede considerar como referencia general a cualquier vector adecuado.

25 En un aspecto, los BAC utilizados para la generación de ADN humano que se deben insertar, tales como las regiones VDJ o VJ, se recortan, de modo que en la región VDJ o VJ humana final, o parte de la misma, en el mamífero no humano no se duplica o se pierde ninguna secuencia en comparación con la secuencia genómica humana original.

30 En un aspecto, que no forma parte de la invención reivindicada, la divulgación se refiere a un vector que comprende un inserto, que comprende preferiblemente una región de ADN humano de alguno de los loci VDJ o VJ humanos, flanqueados por ADN que no es de esos loci. El ADN flanqueante puede comprender uno o más marcadores seleccionables o uno o más sitios de recombinación específicos de sitio. En un aspecto, el vector comprende 2 o más,

35 tal como 3, sitios de recombinación específicos de sitio heteroespecíficos e incompatibles. En un aspecto, los sitios de recombinación específicos de sitio pueden ser sitios loxP, o variantes de los mismos, o sitios FRT o variantes de los mismos. En un aspecto, el vector comprende una o más secuencias ITR (repetición terminal invertida) del transposón.

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

45 En un aspecto, el ADN de la región constante de la cadena ligera humana puede incluirse en el genoma celular, de modo que podría generarse una cadena de anticuerpo humano lambda o kappa completamente humana, pero esto sólo sería capaz de formar un anticuerpo con una cadena pesada químérica, y no producir un anticuerpo completamente humano que tenga regiones variables y constantes humanas.

En un aspecto, el genoma de un mamífero no humano se modifica para evitar la expresión de anticuerpos totalmente específicos de la especie anfitriona. Los anticuerpos totalmente específicos de la especie anfitriona son anticuerpos que tienen regiones variables y constantes del organismo anfitrión. En este contexto, no se pretende que el término

"específico" haga referencia a la unión de los anticuerpos producidos por las células o animales de la divulgación sino más bien con el origen del ADN que codifica esos anticuerpos.

En un aspecto, el genoma de mamífero no humano se modifica para prevenir la expresión de los anticuerpos nativos (completamente específicos de la especie anfitriona) en el mamífero mediante la inactivación de todo o una parte de

- 5 los loci de Ig de mamífero no humano anfitrión. En un aspecto, esto se logra mediante la inversión de toda o parte de la región VDJ de mamífero no humano, o región VJ, opcionalmente mediante la inserción de uno o más sitios de recombinasa específicos de sitio en el genoma y después el uso de estos sitios en la escisión mediada por recombinasa o inversión de todo o una parte del locus de Ig de mamífero no humano. En un aspecto, se puede emplear una doble inversión, la primera para alejar los V(D)J del locus endógeno y después una inversión más local 10 que los coloca en la orientación correcta. En un aspecto, se utiliza un solo sitio *loxP* para invertir la región VDJ de mamífero no humano en un locus centromérico o un locus telomérico.

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

- 15 Los siguientes métodos divulgados no están abarcados por el texto de las reivindicaciones, pero se consideran útiles para comprender la invención.

La divulgación comprende un método para la inserción de múltiples fragmentos de ADN en una diana de ADN, adecuadamente para formar una inserción contigua en la que los fragmentos insertados se unen directamente sin secuencias intermedias. El método es especialmente aplicable a la inserción de un fragmento de ADN grande en un cromosoma anfitrión que puede llevarse a cabo de forma gradual.

- 20 En un aspecto, el método comprende la inserción de una primera secuencia de ADN en una diana, teniendo la secuencia una porción de vector de ADN y una primera secuencia de interés (X1); inserción de una segunda secuencia de ADN en la porción de vector de la primera secuencia, teniendo la segunda secuencia de ADN una segunda secuencia de interés (X2) y una segunda porción de vector; y después escisión de cualquier secuencia de ADN del vector que separe X1 y X2 para proporcionar una secuencia X1X2 o X2X1 contigua dentro de la diana. Opcionalmente, hay una inserción de una o más secuencias de ADN adicionales, teniendo cada secuencia de ADN 25 una secuencia de interés adicional (X3,...) y una porción de vector adicional, en la porción de vector de la secuencia de ADN anterior, para construir un fragmento de ADN contiguo en la diana.

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

- 30 El método general se describe en el presente documento con relación a la inserción de elementos de la región VDJ humana, pero es aplicable a la inserción de cualquier región de ADN, de cualquier organismo, y en particular a la inserción de fragmentos de ADN grandes de > 100 kB, tal como 100 - 250 kb, o incluso mayores, tal como el del TCR o el HLA. Las características y enfoques descritos en el presente documento con respecto a la inserción de VDJ pueden aplicarse igualmente a cualquiera de los métodos divulgados.

- 35 En un aspecto, el ADN insertado es ADN humano, tal como la región VDJ o VJ humana, que se construye en el genoma de una célula, tal como una célula ES, de manera gradual utilizando 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 o más inserciones separadas para cada región de cadena pesada o cadena ligera. Los fragmentos se insertan adecuadamente en el mismo o sustancialmente el mismo locus celular, p. ej., locus de células ES, uno tras otro, para 40 formar la región VDJ o VJ completa, o parte de la misma. La presente divulgación también se refiere a células y animales no humanos que comprenden intermedios en el procedimiento cuyos genomas pueden comprender solo una región VDJ parcial, tal como solo el ADN de la región variable humana.

En un aspecto adicional, el método para producir un mamífero no humano transgénico comprende la inserción de regiones VDJ o VJ humanas aguas arriba de la región constante de mamífero no humano anfitrión mediante la inserción gradual de múltiples fragmentos mediante recombinación homóloga, preferiblemente utilizando un procedimiento iterativo. Se insertan adecuadamente fragmentos de aproximadamente 100 KB del locus VDJ y VJ humano, adecuadamente para formar parte de, o una región VDJ o VJ completa, después de la iteración final del procedimiento de inserción, como se divulga en el presente documento.

- 45 En un aspecto, el procedimiento de inserción comienza en un sitio donde se ha insertado un casete de inicio en el genoma de una célula, tal como una célula ES, proporcionando una región de direccionamiento única. En un aspecto, el casete de inicio se inserta en el locus de la cadena pesada de un mamífero no humano, para su uso en la inserción

- de ADN de cadena pesada humana. De manera similar, se inserta un casete de inicio en el locus de la cadena ligera de un mamífero no humano, para su uso en la inserción de ADN de VJ de cadena ligera humana. El casete de inicio comprende adecuadamente una secuencia de la cadena principal del vector con la que puede recombinarse un vector que tiene un fragmento de ADN humano en la misma secuencia de la cadena principal para insertar el ADN humano en el genoma de la célula (p. ej., ES), y adecuadamente un marcador de selección, tal como un marcador de selección negativa. Adecuadamente, la secuencia de la cadena principal del vector es la de una biblioteca de BAC, para permitir que se utilicen BAC en la construcción de células ES y mamíferos. Sin embargo, la secuencia de la cadena principal del vector puede ser cualquier secuencia que sirva como un sitio diana en el que se puede insertar una secuencia homóloga, por ejemplo, mediante recombinación homóloga y RMCE, y preferiblemente no es ADN que codifique ninguna de las regiones VDJ o constante.
- En un aspecto, la inserción del primer fragmento de ADN en un casete de inicio va seguida de la inserción de un segundo fragmento de ADN en una porción del primer fragmento de ADN, adecuadamente una parte de la cadena principal del vector del segundo fragmento de ADN. En un aspecto, un fragmento de ADN insertado comprende una parte de la región VDJ humana flanqueada por secuencias 5' y/o 3' que no son de la región VDJ humana. En un aspecto, las secuencias flanqueantes 5' y/o 3' pueden contener cada una uno o más marcadores seleccionables, o ser capaces de crear un sistema seleccionable una vez insertado en el genoma. En un aspecto, una o ambas secuencias flanqueantes pueden eliminarse del genoma in vitro o in vivo, después de la inserción. En un aspecto, el método comprende la inserción de un fragmento de ADN seguida de la selección de los extremos 5' y 3' del fragmento insertado que flanquean el ADN de VDJ humano. En un aspecto, la inserción iterativa se realiza mediante la inserción de fragmentos de ADN en el extremo 5' del fragmento insertado previamente, y en este aspecto puede haber delección in vivo del ADN vector que separa las secuencias de ADN humano insertadas, para proporcionar una secuencia contigua de ADN humano.
- En un aspecto, la inserción de ADN de VDJ humano en un genoma se puede lograr sin dejar ningún ADN flanqueante en el genoma, por ejemplo, mediante escisión de ADN mediada por transposasa. Una transposasa adecuada es la transposasa Piggybac.
- En un aspecto, el primer fragmento de región variable humana se inserta mediante recombinación homóloga en la secuencia de la cadena principal del casete de inicio y después el ADN de cualquier marcador de selección negativa y el casete de inicio se eliminan posteriormente mediante recombinación entre secuencias diana de recombinasa, tal como FRT utilizando en este ejemplo Expresión FLPasa. Generalmente, se repiten las inserciones dirigidas repetidas en la secuencia de inicio de la cadena principal (p. ej., BAC) y la posterior eliminación mediante reordenamiento entre secuencias diana de recombinasa para construir toda la región VDJ humana aguas arriba de la región constante que no es de mamífero del anfitrión.
- En un aspecto, se puede utilizar en el método un marcador seleccionable o sistema. El marcador puede generarse tras la inserción de un fragmento de ADN en un genoma, por ejemplo, formando un marcador seleccionable junto con un elemento de ADN ya presente en el genoma.
- En un aspecto, el genoma de la célula (p. ej., ES) no contiene 2 marcadores seleccionables idénticos al mismo tiempo durante el procedimiento. Se puede observar que el procedimiento iterativo de inserción y selección se puede llevar a cabo utilizando sólo 2 marcadores de selección diferentes, como se divulga en los ejemplos del presente documento, y por ejemplo el tercer marcador seleccionable puede ser idéntico al primer marcador, puesto que, en el momento de inserción del tercer fragmento de vector, se han eliminado el primer fragmento de vector y el primer marcador.
- En un aspecto, se confirma un evento de inserción correcto antes de pasar a la siguiente etapa de cualquier procedimiento de clonación de múltiples etapas, por ejemplo, mediante la confirmación de la estructura de BAC utilizando matrices genómicas de alta densidad para seleccionar células ES para identificar aquellas con inserciones de BAC intactas, secuenciación y verificación por PCR.
- En un aspecto, el método utiliza recombinación específica de sitio para la inserción de uno o más vectores en el genoma de una célula, tal como una célula ES. Los sistemas de recombinasa específica de sitio son bien conocidos en la técnica y pueden incluir Cre-lox y FLP/FRT o combinaciones de los mismos, en los que la recombinación se produce entre 2 sitios que tienen homología de secuencia.
- Los BAC adecuados están disponibles en el centro Sanger, véase "A genome-wide, end-sequenced 129Sv BAC library resource for targeting vector construction". Adams DJ, Quail MA, Cox T, van der Weyden L, Gorick BD, Su Q, Chan WI, Davies R, Bonfield JK, Law F, Humphray S, Plumb B, Liu P, Rogers J, Bradley A. Genomics. diciembre de 2005;86(6):753-8. Publicación electrónica del 27 de octubre de 2005. The Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton,

Cambridgeshire CB10 1SA, Reino Unido. Los BAC que contienen ADN humano también están disponibles, por ejemplo, en Invitrogen. Una biblioteca adecuada es descrita por Osoegawa K *et al*, Genome Research 2001. 11: 483-496.

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

- 5 (1) inserción de un primer fragmento de ADN en una célula ES no humana, conteniendo el fragmento una primera porción de ADN de la región VDJ o VJ humana y una primera porción de vector que contiene un primer marcador seleccionable;
- (2) opcionalmente delección de una parte de la primera porción del vector;
- 10 (3) inserción de un segundo fragmento de ADN en una célula ES no humana que contiene el primer fragmento de ADN, produciéndose la inserción dentro de la primera porción del vector, conteniendo el segundo fragmento de ADN una segunda porción de la región VDJ o VJ humana y conteniendo una segunda porción del vector un segundo marcador seleccionable,
- (4) delección del primer marcador seleccionable y la primera porción del vector, preferiblemente mediante la acción de una enzima recombinasa;
- 15 (5) inserción de un tercer fragmento de ADN en una célula ES no humana que contiene el segundo fragmento de ADN, produciéndose la inserción dentro de la segunda porción del vector, conteniendo el tercer fragmento de ADN una tercera porción de la región VDJ o VJ humana y conteniendo una tercera porción del vector un tercer marcador seleccionable,
- (6) delección del segundo marcador seleccionable y la segunda porción de vector; y
- 20 (7) iteración de las etapas de inserción y delección, según sea necesario, para un cuarto fragmento y fragmentos adicionales de las regiones VDJ o VJ humanas, según sea necesario, para producir una célula ES con una parte o toda la región VDJ o VJ humana insertada como se divulga en el presente documento y adecuadamente eliminar todas las porciones del vector dentro del genoma de la célula ES.

En otro aspecto, la divulgación comprende

- 25 1 inserción de ADN que forma un casete de inicio en el genoma de una célula;
- 2 inserción de un primer fragmento de ADN en el casete de inicio, comprendiendo el primer fragmento de ADN una primera porción de un ADN humano y una primera porción de vector que contiene un primer marcador seleccionable o genera un marcador seleccionable tras la inserción;
- 3 opcionalmente eliminación de parte del ADN del vector
- 30 4 inserción de un segundo fragmento de ADN en la porción de vector del primer fragmento de ADN, conteniendo el segundo fragmento de ADN una segunda porción de ADN humano y una segunda porción de vector, conteniendo la segunda porción de vector un segundo marcador seleccionable, o generando un segundo marcador seleccionable tras la inserción;
- 5 opcionalmente, eliminación de cualquier ADN vector para permitir que el primer y segundo fragmentos de ADN humano formen una secuencia contigua; y
- 6 iteración de las etapas de inserción de ADN de VDJ humano y eliminación de ADN del vector, según sea necesario, para producir una célula con toda o parte de la región VDJ o VJ humana suficiente para ser capaz de generar un anticuerpo químérico junto con una región constante del anfitrión, en donde la inserción de uno, o más, o todos los fragmentos de ADN utiliza recombinación específica de sitio.
- 40 En un aspecto, el mamífero no humano es capaz de generar una diversidad de al menos 1×10^6 combinaciones de secuencias de inmunoglobulinas químéricas funcionales diferentes.

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

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

En un aspecto, el roedor es un ratón.

Las células ES descritas en el presente documento, pero que no forman parte de la invención reivindicada, se pueden utilizar para generar animales utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica, que comprenden la inyección de la célula ES en un blastocisto seguida de la implantación de blastocistos químéricos en hembras para producir descendencia que puede ser criada y seleccionada para obtener recombinantes homocigotos que tengan la inserción requerida. En un aspecto, la divulgación se refiere a un animal químérico compuesto de tejido derivado de células ES y tejido derivado de embrión anfitrión. En un aspecto, la divulgación se refiere a animales de generación posterior genéticamente alterados, que incluyen animales que tienen recombinantes homocigotos para las regiones VDJ y/o VJ.

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

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

En un aspecto adicional, la divulgación, que no está abarcada por el texto de las reivindicaciones, pero se considera útil para comprender la invención, se refiere a anticuerpos humanizados y cadenas de anticuerpos producidos según la presente divulgación, tanto en forma químérica como completamente humanizada, y al uso de dichos anticuerpos en medicina. La divulgación también se refiere a una composición farmacéutica que comprende tales anticuerpos y un portador u otro excipiente farmacéuticamente aceptables.

Las cadenas de anticuerpos que contienen secuencias humanas, tales como cadenas de anticuerpos humanas-no humanas químéricas, se consideran humanizadas en el presente documento en virtud de la presencia de la región de regiones codificantes de proteínas humanas. Se pueden producir anticuerpos completamente humanizados a partir de ADN que codifica una cadena de anticuerpo químérica de la divulgación utilizando técnicas convencionales.

Los métodos para la generación de anticuerpos tanto monoclonales como policlonales son bien conocidos en la técnica, y la presente divulgación se refiere a anticuerpos tanto policlonales como monoclonales de anticuerpos químéricos o completamente humanizados producidos en respuesta a la exposición a antígenos en mamíferos no humanos de la presente divulgación.

En otro aspecto más, los anticuerpos o las cadenas de anticuerpos químéricos generados en la presente divulgación se pueden manipular, adecuadamente a nivel de ADN, para generar moléculas con propiedades o estructura similares a los anticuerpos, tales como una región variable humana de una cadena pesada o ligera sin una región constante, por ejemplo, un anticuerpo de dominio; o una región variable humana con cualquier región constante de cadena pesada o ligera de la misma o diferente especie; o una región variable humana con una región constante que no se produce de forma natural; o región variable humana junto con cualquier otro compañero de fusión. La divulgación se refiere a todos estos derivados de anticuerpos químéricos derivados de anticuerpos químéricos identificados según la presente divulgación.

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

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

- 5 La divulgación, que no forma parte de la invención, también se refiere a un kit que comprende un anticuerpo o derivado de anticuerpo como se divulga en el presente documento e instrucciones para el uso de tal anticuerpo o un reactivo de laboratorio adecuado, tal como un tampón o un reactivo de detección de anticuerpos.

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

Un mamífero no humano cuyo genoma comprende:

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

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

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

- 15 y opcionalmente en donde el genoma de mamífero no humano se modifica para evitar la expresión de anticuerpos completamente específicos de la especie anfitriona.

Una célula ES de mamífero no humano cuyo genoma comprende:

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

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

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

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

- 30 (a) la región VDJ de IgH humana aguas arriba de la región constante de cadena pesada de mamífero no humano anfitrión, y

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

- 35 de tal manera que el mamífero no humano sea capaz de producir un repertorio de anticuerpos químéricos que tienen una región constante de mamífero no humano y una región variable humana, en donde las etapas (a) y (b) se pueden llevar a cabo en cualquier orden y cada una de las etapas (a) y (b) se puede llevar a cabo de forma gradual o como una sola etapa.

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

- 40 En un aspecto, las inserciones graduales comienzan en un sitio donde se ha insertado un casete de inicio en el genoma de una célula ES que proporciona una región de direccionamiento única que consiste en una secuencia de la cadena principal de BAC y un marcador de selección negativa.

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

- 5 En un aspecto, se repiten inserciones dirigidas repetidas en la secuencia de inicio de la cadena principal de BAC y la posterior eliminación de la cadena principal mediante reordenamiento entre secuencias diana de recombinasa para construir toda la región VDJ humana aguas arriba de la región constante que no es de mamífero anfitrión.

Otros aspectos incluyen:

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

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

- 15 15 Un roedor en donde una secuencia de ADN de una región codificante humana está en un ordenamiento funcional con una secuencia de control de un mamífero no humano, de manera que la transcripción del ADN está controlada por la secuencia de control de un mamífero no humano. En un aspecto, la región codificante humana, región V, D o J, está en un ordenamiento funcional con una secuencia promotora de ratón.

- 20 20 La divulgación, que no forma parte de la invención, también se refiere a un anticuerpo humanizado producido según cualquiera de los métodos divulgados en el presente documento y al uso de un anticuerpo humanizado así producido en medicina.

- 25 25 Se entenderá que las realizaciones particulares descritas en el presente documento se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención. Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de conocimiento práctico de los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. El uso de la palabra "un", "uno" o "una" cuando se utiliza junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es compatible con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno". El uso del término "o" en las reivindicaciones se utiliza para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere únicamente a alternativas o que las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere únicamente a alternativas e "y/o". A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se utiliza para indicar que un valor incluye la variación inherente del error del dispositivo, empleándose el método para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos del estudio.

- 30 35 Como se emplean en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, las palabras "que comprende" (y cualquier forma de "que comprende", tal como "comprenden" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de "que tiene", tal como "tienen" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de "que incluye", tal como "incluye" e "incluyen") o "que contiene" (y cualquier forma de "que contiene", tal como "contiene" y "contienen") son inclusivas o abiertas y no excluyen elementos o etapas de métodos adicionales no citados.

- 40 45 El término "o combinaciones de los mismos" como se emplea en el presente documento se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos enumerados que preceden al término. Por ejemplo, se pretende que "A, B, C, o combinaciones de los mismos incluya al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Siguiendo con este ejemplo, se incluyen expresamente combinaciones que contienen repeticiones de uno o más elementos o términos, tales como BB, AAA, MB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, etc. El experto en la técnica entenderá que típicamente no hay límite en el número de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que se desprenda lo contrario del contexto.

Cualquier parte de esta divulgación puede leerse combinada con cualquier otra parte de la divulgación, a menos que se desprenda lo contrario del contexto.

Todas las composiciones y/o métodos divulgados y reivindicados en el presente documento pueden elaborarse y ejecutarse sin experimentación indebida a la luz de la presente divulgación.

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

5 **Ejemplo 1 (ejemplo de referencia)**

Estrategia global

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

10 La inserción de alta fidelidad de regiones VDJ intactas en cada locus en su configuración nativa (tipo salvaje) se logra adecuadamente mediante la inserción de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) humanos en el locus. Adecuadamente, los BAC se recortan de manera que en el locus final no se duplique ni se pierda ninguna secuencia 15 en comparación con la original. Tal recorte se puede llevar a cabo mediante modificación genética *in vivo* mediada por recombinación homóloga.

15 Los BAC humanos relevantes, adecuadamente recortados que cubren estos loci, tienen un tamaño promedio de 90 kb.

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

25 De manera adecuada, el rendimiento de cada locus se evalúa después de la primera inserción de BAC utilizando ratones químéricos y también después de cada adición posterior de BAC. Véase a continuación una descripción detallada de esta prueba de rendimiento.

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

35 No todos los BAC conservan su configuración de tipo salvaje cuando se insertan en el genoma de las células ES. Por lo tanto, los autores de la presente invención implementaron matrices genómicas de alta densidad para escrutar células ES e identificar aquellas con inserciones de BAC intactos (Barrett, MT, Scheffer, A., Ben-Dor, A., Sampas, N., Lipson, D., Kincaid, R., Tsang, P., Curry, B., Baird, K., Meltzer, PS, *et al* (2004) Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 17765-17770). Este escrutinio también permite identificar y seleccionar clones de ES en los que el genoma de las células ES está comprometido y, por lo tanto, no es capaz de poblar la línea germinal de animales químéricos. Otras herramientas genómicas adecuadas para facilitar esta evaluación incluyen la secuenciación y la verificación por PCR.

40 De este modo, en un aspecto se confirma la estructura de BAC correcta antes de pasar a la siguiente etapa.

45 Está implícito en la descripción anterior que para mediante ingeniería genética completamente los loci con BAC de 90 kb, es necesario realizar un mínimo de 10 etapas de direccionamiento para *IgH* y 5 etapas para *IgK*. Los ratones con un locus IgL se pueden generar de manera similar al locus IgK. Se requieren etapas adicionales para eliminar los marcadores de selección necesarios para respaldar el direccionamiento génico. Dado que estas manipulaciones se realizan en células ES de forma gradual, en un aspecto la capacidad de transmisión de la línea germinal se conserva durante todo este procedimiento.

50 En la presente invención puede ser importante mantener el rendimiento de los clones de células ES a través de múltiples rondas de manipulación sin la necesidad de probar el potencial de la línea germinal de la línea de células ES en cada etapa. Las líneas celulares actualmente en uso para los proyectos de inactivación génica globales KOMP y EUCOMM se modificaron dos veces antes de su uso para este proyecto y sus tasas de transmisión de la línea germinal no cambian desde las células parentales (estas líneas están disponibles públicamente, véase www.komp.org

y www.eucomm.org). Esta línea celular, denominada JM8, puede generar ratones 100% derivados de células ES en las condiciones de cultivo publicadas (Pettitt, SJ, Liang, Q., Rairdan, XY, Moran, JL, Prosser, HM, Beier, DR, Lloyd, KC, Bradley, A. y Skarnes, WC (2009). Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. *Nature Methods.*). Estas células han demostrado capacidad para contribuir de forma reproducible al tejido somático y de la línea germinal de animales químéricos utilizando condiciones convencionales de cultivo de células ES de ratón. Esta capacidad se puede encontrar con células cultivadas en una línea celular alimentadora convencional (SNL) e incluso sin alimentador, cultivadas solo en placas de cultivo de tejidos recubiertas de gelatina. Una sublínea particular, JM8A3, mantuvo la capacidad de poblar la línea germinal de quimeras después de varias rondas seriadas de subclonación. Una manipulación genética extensa mediante, por ejemplo, recombinación homóloga, como sería el caso en la presente invención, no puede comprometer la pluripotencia de las células. La capacidad de generar quimeras con un porcentaje tan alto de tejido derivado de células ES tiene otras ventajas. En primer lugar, los altos niveles de quimerismo se correlacionan con el potencial de transmisión de la línea germinal y proporcionan un ensayo sustituto para la transmisión de la línea germinal en solo de 5 a 6 semanas. En segundo lugar, dado que estos ratones provienen 100% de células ES, los loci modificados genéticamente se pueden probar directamente, eliminando el retraso causado por la reproducción. Es posible probar la integridad de los nuevos loci de Ig en la quimera, ya que el embrión anfitrión derivará de animales mutantes para el gen RAG-1, como se describe en la siguiente sección.

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

Complementación de RAG-1

20 Aunque muchos clones generarán ratones 100% derivados de ES, otros no. Por lo tanto, en cada etapa se generan ratones en un entorno con deficiencia de RAG-1. Esto proporciona ratones con células B y T 100% derivadas de ES que pueden utilizarse directamente para la inmunización y la producción de anticuerpos. Se pueden utilizar células que tienen un fondo con deficiencia de RAG-2, o un fondo con deficiencia combinada de RAG-1/RAG-2, o mutaciones equivalentes en las que los ratones producen sólo células B y/o células T derivadas de células ES.

25 Para que sólo los loci *IgH* o *IgK* de humano-ratón estén activos en estos ratones, los loci, *IgH* e *IgK* de humano-ratón se pueden modificar genéticamente en una línea celular en la que un alelo del locus *IgH* o *IgK* ya ha sido inactivado. Alternativamente, la inactivación del locus de Ig del anfitrión, tal como el locus *IgH* o *IgK*, se puede llevar a cabo después de la inserción.

30 Las cepas de ratón que tienen el gen RAG-1 mutado son inmunodeficientes ya que no tienen linfocitos B o T maduros (Documento US 5.859.307). Los linfocitos T y B sólo se diferencian si se produce una recombinación V(D)J adecuada. Dado que RAG-1 es una enzima crucial para esta recombinación, los ratones que carecen de RAG-1 son inmunodeficientes. Si los embriones anfitriones son genéticamente mutantes homocigotos para RAG-1, una quimera producida mediante la inyección de tal embrión no podrá producir anticuerpos si los tejidos linfoideos del animal se obtienen del embrión anfitrión. Sin embargo, las células JM8 y las células AB2.1, por ejemplo, generalmente contribuyen con más de 80% de los tejidos somáticos del animal químérico y, por lo tanto, normalmente poblarían el tejido linfoide. Las células JM8 tienen actividad RAG-1 de tipo salvaje y, por lo tanto, los anticuerpos producidos en el animal químérico serían codificados únicamente por el genoma de la célula ES JM8 modificada genéticamente. Por lo tanto, el animal químérico puede ser expuesto a un antígeno mediante inmunización y posteriormente producir anticuerpos contra ese antígeno. Esto permite a un experto en la técnica probar el rendimiento de los loci *IgH* e *IgK* humanos/de ratón modificados genéticamente como se describe en la presente divulgación. Véanse las figuras 19 y 20.

40 Un experto en la técnica utilizaría el animal químérico como se describe para determinar el grado de diversidad de anticuerpos (véase, p. ej., Harlow, E. & Lane, D. 1998, 5^a edición, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, Nueva York). Por ejemplo, se podría determinar la existencia en el suero del animal químérico de ciertos epitopos de anticuerpos mediante unión a un antisuero antiidiotípico específico, por ejemplo, en un ensayo ELISA. Un experto en la técnica también podría secuenciar los genomas de clones de células B obtenidos del animal químérico y comparar dicha secuencia con la secuencia de tipo salvaje para determinar el nivel de hipermutación, indicando dicha hipermutación una maduración normal del anticuerpo.

45 Un experto en la técnica también utilizaría dicho animal químérico para examinar la función del anticuerpo en donde dichos anticuerpos están codificados a partir de los loci de Ig modificados genéticamente (véase, por ejemplo, Harlow, E. & Lane, D. 1998, 5^a edición, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, Nueva York). Por ejemplo, se podrían probar antisueros para determinar la unión de un antígeno, utilizándose dicho antígeno

para inmunizar al animal químico. Tal medición podría realizarse mediante un ensayo ELISA. Alternativamente, un experto en la técnica podría probar la neutralización del antígeno mediante la adición de los antisueros recogidos del animal químico apropiadamente inmunizado.

5 Los expertos en la técnica saben bien que los resultados positivos de cualquiera de estas pruebas demuestran la capacidad de los loci de Ig modificados genéticamente, objeto de la presente invención, para codificar anticuerpos con regiones variables humanas y regiones constantes de ratón, siendo dichos anticuerpos capaces de funcionar a la manera de los anticuerpos de tipo salvaje.

Técnicas Experimentales

10 La modificación genética in vivo mediada por recombinación homóloga para la producción de vectores para uso en recombinación homóloga en células ES se divulga, por ejemplo, en los documentos WO9929837 y WO0104288, y los mecanismos son bien conocidos en la técnica. En un aspecto, la modificación genética in vivo mediada por recombinación homóloga del ADN humano tiene lugar utilizando BAC como fuente de dicho ADN humano. El ADN de BAC humano se aislará utilizando el kit de purificación de BAC de Qiagen. La cadena principal de cada BAC humano se modificará utilizando modificación genética in vivo mediada por recombinación homóloga a una configuración exactamente igual o similar a la del BAC ya insertado en la región IgH de ratón. El inserto genómico de cada BAC humano se recortará mediante modificación genética in vivo mediada por recombinación homóloga de modo que una vez que se inserten los BAC, se forme una parte contigua sin fisuras de la región genómica V(D)J humana en el locus IgH o IgK de ratón. La transfección de ADN de BAC mediante electroporación y genotipificación se realizará de acuerdo con protocolos convencionales (Prosser, HM, Rzadzinska, AK, Steel, KP y Bradley, A. (2008). Mosaic complementation demonstrates a regulatory role for myosin VIIa in actin dynamics of stereocilia. Molecular and Cellular Biology 28, 1702-1712; Ramirez-Solis, R., Davis, AC y Bradley, A. (1993). Gene targeting in embryonic stem cells. Methods in enzymology 225, 855-878). La modificación genética in vivo mediada por recombinación homóloga se realizará utilizando los procedimientos y reactivos desarrollados por los laboratorios de Pentao Liu y Don Court (Chan, W., Costantino, N., Li, R., Lee, SC, Su, Q., Melvin, D., Court, DL, y Liu, P. (2007). A recombineering based approach for high-throughput conditional knockout targeting vector construction. Nucleic Acids Research 35, e64).

15

20

25

Estas y otras técnicas para el direccionamiento de genes y la recombinación de fragmentos cromosómicos derivados de BAC en un genoma de mamífero no humano, tal como un ratón, se divultan, por ejemplo, en

<http://www.eucomm.org/information/targeting/> y

<http://www.eucomm.org/information/publications>.

30 El cultivo celular de líneas celulares derivadas de C57BL/6N, tales como las células ES masculinas JM8, seguirá técnicas convencionales. Se ha demostrado que las células ES JM8 son competentes para contribuir ampliamente a los tejidos somáticos y a la línea germinal, y se están utilizando para grandes programas de mutagénesis en ratones en el Instituto Sanger, tales como EUCOMM y KOMP (Pettitt, SJ, Liang, Q., Raideran, XY, Moran, JL, Prosser, HM, Beier, DR, Lloyd, KC, Bradley, A. y Skarnes, WC (2009). Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. Nature Methods). Las células ES JM8 (1,0X10⁷) se someterán a electroporación (500 µF, 230 V; BioRad) con 10 µg de ADN de BAC humano linealizado con I-SceI. Los transfectantes se seleccionarán con Puromicina (3 µg/ml) o G418 (150 µg/ml). La selección comenzará 24 horas (con G418) o 48 horas (con Puromicina) después de la electroporación y continuará durante 5 días. 10 µg de ADN de BAC humano linealizado pueden producir hasta 500 colonias de células ES resistentes a Puromicina o G418. Las colonias de células ES resistentes a antibióticos se recogerán en placas de cultivo celular de 96 pocillos para realizar la genotipificación para identificar los clones elegidos como diana.

35

40

45 Una vez que se identifican los clones de células ES de ratón elegidos como diana, se analizarán mediante hibridación genómica comparativa (CGH) de matrices para determinar la integridad total del genoma (Chung, YJ, Jonkers, J., Kitson, H., Fiegler, H., Humphray, S., Scott, C., Hunt, S., Yu, Y., Nishijima, I., Velds, A., et al (2004). A whole-genome mouse BAC microarray with 1 Mb for analysis of DNA copy number changes by array comparative genomic hybridization. Genome research 14, 188-196, y Liang, Q., Conte, N., Skarnes, WC y Bradley, A. (2008). Extensive genomic copy number variation in embryonic stem cells Proceedings of the national academy of Sciences of the United States of America 105, 17453-17456). Las células ES que tienen genomas anormales no contribuyen de manera eficiente a la línea germinal de los ratones químicos. La integridad de BAC se examinará amplificando por PCR cada gen V funcional conocido en el BAC. Por ejemplo, en un enfoque, el primer BAC humano elegido para el locus IgH tiene 6 genes V funcionales. Para confirmar la integridad de este BAC para determinar la presencia de estos 6 genes V de IgH, se diseñarán y utilizarán al menos 14 pares de cebadores de PCR para amplificar por PCR el ADN

50

genómico de las células ES elegidas como diana. El tamaño y la secuencia de tipo salvaje humano de estos fragmentos garantizarán que el BAC insertado no se haya reordenado.

Una CGH más detallada también confirmará la integridad de los BAC insertados. Por ejemplo, un experto en la técnica podría utilizar una plataforma oligo aCGH, desarrollada por Agilent Technologies, Inc. Esta plataforma no sólo permite

- 5 estudiar la variación del número de copias del ADN en todo el genoma a alta resolución (Barrett, MT, Scheffer, A., Ben-Dor, A., Sampas, N., Lipson, D., Kincaid, R., Tsang, P., Curry, B., Baird, K., Meltzer, PS, *et al.* (2004). Comparative genomic hybridization using oligonucleotide arrays and total genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 17765-17770), sino que también permiten el examen de una región del genoma específica utilizando matrices diseñadas a medida. En comparación con las técnicas tradicionales de aCGH
- 10 que se basan en sondas de ADNc o sondas BAC completas, las sondas de oligonucleótidos de 60 unidades pueden garantizar una hibridación específica y la alta sensibilidad y precisión necesarias para detectar las alteraciones cromosómicas modificadas genéticamente que han realizado los autores de la presente invención. Por ejemplo, los oligos diseñados para hibridarse a intervalos regulares a lo largo de toda la longitud del BAC insertado detectarían incluso delecciones, inserciones u otros reordenamientos bastante cortos. Asimismo, esta plataforma proporciona la
- 15 mayor flexibilidad para diseños de microcromatrices personalizadas. El ADN genómico de las células ES elegidas como diana y el ADN genómico individual humano normal se marcarán por separado con colorantes e hibridarán con la matriz. Los portaobjetos con matrices se escanearán utilizando un escáner de micromatrices de ADN de Agilent Technologies. Las intensidades de fluorescencia recíprocas del colorante Cy5 y el colorante Cy3 en cada imagen de matriz y los valores log₂ de la razón se extraerán utilizando el soporte lógico Bluefuse (Bluegnome). Los puntos con patrones de fluorescencia incongruentes ("confianza" <0,29 o "calidad" = 0) se excluirán antes de normalizar todos los valores log₂ de la razón. En un experimento, un Log₂ de la razón entre -0,29 y +0,29 para la señal de cualquier oligosonda se considera como ausencia de cambio en el número de copias. El umbral del log₂ de la razón para "duplicación" es normalmente >0,29999 y para la delección es <0,29999.

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

30 El direccionamiento del genoma de una célula ES para producir un ratón transgénico se puede llevar a cabo utilizando un protocolo como se explica con referencia a las figuras 1 a 18 adjuntas.

35 La Figura 1 ilustra tres vectores de la cadena principal básicos; un casete de inicio y 2 vectores de inserción grandes 1 y 2 respectivamente. El casete de inicio comprende secuencias homólogas al sitio de inserción deseado en el genoma del ratón, flanqueando esos sitios un marcador seleccionable y una secuencia de cebador de relleno ("Stuffer") para la genotipificación basada en PCR para confirmar la inserción correcta de BAC. La secuencia del cebador de relleno proporciona la base para genotipificar cada etapa de adición de BAC. Se considera que esta secuencia proporciona un molde de secuencia sólido y bien validado para el cebador de PCR y puede ubicarse en el sitio IScel, idealmente a ~1 kb del inserto BAC.

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

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

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

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

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

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

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

20 La Figura 5 ilustra un segundo vector de inserto grande dirigido al cromosoma de la célula ES. El BAC humano se dirige al locus IgH de ratón utilizando la misma inserción del casete de inicio seguida de linealización de BAC con *ISceI*, direccionamiento de BAC al casete de inicio y estrategia de genotipificación de reparación de huecos. La verificación de la inserción del BAC se realiza como antes.

25 La Figura 6 ilustra la cadena principal de BAC flanqueada por FRTY del vector de inserto grande 2 y el marcador neo se elimina mediante Flpo. Obsérvese que esto no se puede seleccionar, por lo que será necesario para el análisis clonal en este punto. Esto permitirá la confirmación de la yuxtaposición del inserto 2 humano con el 1 humano y otros esfuerzos de validación.

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

30 La Figura 7 ilustra el siguiente vector de inserto grande dirigido al locus IgH de ratón. A continuación, se retira el casete pu-delta TK, como en la figura 4. El procedimiento se puede repetir para incorporar otros BAC.

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

Las Figuras 9 a 18 proporcionan un mayor nivel de detalle de este procedimiento.

Ejemplo 2 (ejemplo de referencia)

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

40 La primera generación de direccionamiento cromosómico basado en SSR implicó la recombinación entre (i) un único sitio diana de recombinación (RT) tal como loxP o FRT en un plásmido transfecido con (ii) un sitio RT cromosómico proporcionado por una integración previa. Un problema importante con este enfoque es que los eventos de inserción son raros ya que la escisión es siempre más eficiente que la inserción. Schlake y Bode introdujeron en 1994 una segunda generación de SSR llamada RMCE (intercambio de casetes mediado por recombinasa) (Schlake, T.; J. Bode (1994). "Use of mutated FLP-recognition-target-(FRT)-sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci". *Biochemistry* 33: 12746-12751). Su método se basa en el uso de dos RT heteroespecíficos e incompatibles en el plásmido transfecido que se pueden recombinar con sitios RT compatibles en el cromosoma, lo que da como resultado el intercambio de una pieza de ADN por otra - o un intercambio de casetes. Este enfoque se ha explotado con éxito en una variedad de direccionamiento cromosómico eficiente, incluida la integración de insertos BAC de más de 50 kb (Wallace, HAC et al. (2007). "Manipulating the mouse genome to engineering precise functional

syntenic replacements with human sequence". Cell 128: 197-209; Prosser, HM et al., (2008). "Mosaic complementation demonstrates a regulatory role for myosin VIIa in actin dynamics of stereocilia". Mol. Cell. Biol. 28: 1702-12).

5 El tamaño de inserción más grande de un BAC es de aproximadamente 300 kb y, por lo tanto, esto impone un límite superior al tamaño del casete para RMCE.

En la presente divulgación los autores de la presente invención utilizan una nueva técnica basada en SSR llamada RMCE secuencial (SRMCE), que permite la inserción continua de insertos BAC en el mismo locus.

El método comprende las etapas de

10 1 inserción de ADN que forma un casete de inicio (también llamado aquí lugar de emplazamiento genómico) en el genoma de una célula;

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

3 3 eliminación de parte del ADN del vector;

15 4 4 inserción de un segundo fragmento de ADN en la porción de vector del primer fragmento de ADN, conteniendo el segundo fragmento de ADN una segunda porción de ADN humano y una segunda porción de vector, conteniendo la segunda porción de vector un segundo marcador seleccionable, o generando un segundo marcador seleccionable tras la inserción

20 5 5 eliminación de cualquier ADN vector para permitir que el primer y segundo fragmentos de ADN humano formen una secuencia contigua; y

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

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

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

1. Direccionamiento de un lugar de emplazamiento genómico al lugar definido. Un vector de entrada que contiene un minigen HPRT flanqueado por las ITR piggyBac (PB) invertidas se dirige a una región definida (por ejemplo: una región entre IGHJ y E⁺ o IGKJ y Ek o IGLC1 y Ea3-1) para servir como lugar de emplazamiento genómico para el direccionamiento de BAC. El minigen HPRT se compone de dos exones sintéticos y un intrón asociado. El exón HPRT 5' está flanqueado por dos sitios loxP heteroespecíficos e incompatibles (uno de tipo salvaje y el otro un sitio mutado, lox5171) en orientación invertida entre sí (Fig. 22). Estos dos sitios loxP proporcionan sitios de recombinación para la inserción de BAC a través de RMCE.

35 2. Inserción del primer BAC modificado en el lugar de emplazamiento genómico elegida como diana. El primer BAC tiene una longitud de ADN que se insertará en el genoma flanqueado por modificaciones diseñadas mediante ingeniería genética. La modificación 5' (loxP - gen neo - lox2272 - promotor PGK - PB5'LTR) y la modificación 3' (PB3'LTR - gen puroΔTK - lox5171) se representan en la Fig. 23 junto con las orientaciones relativas de los sitios lox y las LTR de PB. Con la expresión transitoria de CRE a partir de un vector sometido conjuntamente a electroporación, la secuencia de ADN se insertaría en el locus definido a través de RMCE. Las células en las que se ha producido una inserción correcta se pueden seleccionar de la siguiente manera: (i) resistencia a puromicina (el gen puroΔTK ha adquirido un promotor - "PGK" - del lugar de emplazamiento genómico), (ii) resistencia a 6TG (el minigen HPRT se ha alterado) y (iii) resistencia a G418 (selecciona cualquier inserción a través del ordenamiento de PGK-neo de la región 5'). Se puede utilizar cualquier combinación de estos regímenes de selección. La resistencia a G418 y 6TG selecciona los eventos correctos en el extremo 5' mientras que la resistencia a puro selecciona los eventos correctos en el extremo 3'.

- 5 3. Curado (eliminación) de la modificación 3' de la 1^a inserción. Un primer BAC correctamente insertado da como resultado que el extremo 3' tenga un gen puroΔTK flanqueado por LTR de PB invertidas (Fig. 24), esencialmente una estructura de transposición adecuada. Este transposición se puede eliminar después mediante la expresión transitoria de la transposasa piggyBac (a partir de un vector sometido a electroporación). Las células con el evento de escisión correcto pueden seleccionarse mediante resistencia FIAU, es decir, sin actividad timidina quinasa del gen puroΔTK. Esto elimina completamente la modificación 3' sin dejar rastros de nucleótidos.
- 10 4. Inserción de un 2º BAC modificado en el extremo 5' de la 1^a inserción. El 2º BAC tiene una longitud de ADN que se insertará en el genoma (generalmente destinado a ser contiguo al ADN insertado con el primer BAC) flanqueado por modificaciones diseñadas mediante ingeniería genética. La modificación 5' (loxP - porción 5' del minigen HPRT - lox5171 - promotor PGK - PB5'LTR) y la modificación 3' (PB3'LTR - puroΔTK - lox2272) se representan en la Fig. 25 junto con las orientaciones relativas de los sitios lox y las LTR de PB. Con la expresión CRE transitoria de un vector sometido conjuntamente a electroporación, la secuencia de ADN se insertaría en el locus definido a través de RMCE. Las células en las que se ha producido una inserción correcta se pueden seleccionar de la siguiente manera: (i) resistencia a HAT (el minigen HPRT se reconstituye mediante un evento de inserción correcta, es decir: las estructuras de los exones 5' y 3' se unen), y (ii) el gen de resistencia a puromicina (puroΔTK ha adquirido un promotor - "PGK" - del lugar de emplazamiento genómico).
- 15 5. Curado (eliminación) la modificación 3' de la 2^a inserción. Un 2º BAC correctamente insertado da como resultado que el extremo 3' tenga un gen puroΔTK flanqueado por LTR de PB invertidas (Fig. 26), esencialmente una estructura de transposición adecuada, exactamente análoga a la consecuencia de una 1^a inserción de BAC satisfactoria. Y, por lo tanto, este transposición también puede eliminarse mediante la expresión transitoria de la transposasa piggyBac (a partir de un vector sometido a electroporación). Las células con el evento de escisión correcto pueden seleccionarse mediante resistencia a FIAU, es decir, sin actividad timidina quinasa del gen puroΔTK. Esto elimina completamente la modificación 3' sin dejar rastros de nucleótidos.
- 20 6. Después del curado de la modificación 3' de la 2^a inserción de BAC, el lugar de emplazamiento genómico se vuelve idéntico al original. Todo este procedimiento, etapas 2 a 5, se puede repetir varias veces para crear una inserción grande en el genoma. Cuando se completa, no quedan nucleótidos residuales aparte de la inserción deseada.
- 30

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

- 35 1. Direccionamiento un casete "volteado" a una región 5' a una distancia de 10 a 40 megabases del VDJ o VJ endógenas. El vector volteado (PB3'LTR - promotor PGK - porción 5' del mini gen HPRT - loxP - puroΔTK - promotor CAGGS - PB3'LTR) se representa en la Fig. 27 junto con las orientaciones relativas de los sitios lox y las LTR de PB.
- 40 2. La expresión transitoria de CRE dará como resultado la recombinación entre el sitio loxP en el casete "volteado" y el sitio loxP en la modificación 5'. Esta modificación 5' es la que se describe en las Etapas 2 y 3 anteriores - esencialmente la modificación resultante de la inserción de un número impar de BAC, una vez curada la modificación 3'. Los sitios loxP están invertidos entre sí y, por lo tanto, el evento de recombinación descrito da como resultado una inversión como se muestra en la Fig. 28. Las células con la inversión correcta serán resistentes a HAT ya que el minigen HPRT se reconstituye mediante una inversión correcta.
- 45 3. Una inversión correcta también deja dos estructuras de transposones flanqueando el casete "volteado" y la modificación 5'. Ambos pueden escindirse con expresión transitoria de la transposasa piggyBAC, sin dejar restos de ninguna de las modificaciones (Fig. 29). Las células con las escisiones correctas se pueden seleccionar de la siguiente manera: (i) resistencia a 6TG (se suprime el minigen HPRT) y (ii) resistencia a FIAU (se suprime el gen puroΔTK). Una inversión como la que se describe en los loci de Ig alejaría la región endógena IGH-VDJ o IGK-VJ de la región potenciadora E⁺ o Ek, respectivamente, y conduciría a la inactivación de las regiones endógenas IGH-VDJ o IGK-VJ.
- 50

Los métodos de inserción divulgados en el presente documento proporcionan adecuadamente uno o más de:

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

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

Inactivación de la actividad de IGH o IGK endógenas mediante una inversión; y

- 5 Escisión de modificaciones, sin dejar rastros de nucleótidos en el cromosoma.

Ejemplo 3 (ejemplo de referencia)

La prueba de concepto del enfoque se divulga en la Figura 30. En la Figura 30 se insertó un lugar de emplazamiento genómico como se muestra en la figura 22 en el genoma de un ratón mediante recombinación homóloga, seguido de la inserción del plásmido R21 en ese lugar de emplazamiento genómico mediante recombinación específica de sitio

- 10 mediada por cre. El evento de inserción generó una serie de eventos de inserción generales, 360 colonias resistentes a G418, de las cuales ~220 se insertaron en el locus deseado, como lo demuestra la alteración del minilocus de HPRT.

El vector R21 imita el primer vector de inserción de BAC en los extremos 5' y 3', incluidos todos los elementos de selección y sitios diana de recombinasa. En lugar de secuencias BAC, hay una pequeña secuencia de 'relleno'. Este

- 15 vector probará todos los principios diseñados en la divulgación y permitirá probar fácilmente los resultados en el sentido de que la PCR a través del relleno es factible y, por lo tanto, permite probar fácilmente ambos extremos de la inserción. R21 se sometió a electroporación conjunta con un vector que expresa cre en las células ES que albergan el lugar de emplazamiento genómico en el locus IGH. Se transfecaron cuatro conjuntos de células transformadas en

- 20 paralelo y después se colocaron bajo diferentes regímenes de selección como se indica en la Figura 30. La selección con G418 (expresión del gen neo) dio como resultado el mayor número de colonias debido a que no había ningún requisito para la integración específica del lugar de emplazamiento genómico. Cualquier integración de R21 en el genoma proporcionará expresión de neo que conducirá a la resistencia a G418. La selección con Puro dio como resultado un número de colonias similar a Puro + 6TG o G418 + 6TG, lo que sugiere que la rigurosidad de la selección con Puro se debe a que PuroΔTK carece de un promotor en el vector. La expresión de Puro solo se adquiere cuando 25 se produce una integración cerca de un elemento promotor; en este diseño probablemente específicamente en el lugar de emplazamiento genómico. Estas conclusiones están respaldadas por los resultados de la PCR de unión que se muestra en la Figura 31.

La siguiente etapa en la divulgación consiste en "curar" el extremo 3' del vector BAC integrado, dejando una transición perfecta entre la inserción y el genoma flanqueante. Los autores de la presente invención demostraron este curado

- 30 expandiendo un clon individual desde arriba (R21 insertado en el lugar de emplazamiento genómico) y expresando la recombinasa piggyBac en este clon mediante la transfección de un plásmido de expresión. Se utilizó FIAU para seleccionar colonias en las que se escindió la modificación 3', es decir, mediante la pérdida del elemento 'PGK-puroΔTK' entre las repeticiones terminales piggyBac. Cincuenta de estos clones resultaron de una transfección de

- 35 10⁶ células; de estos los autores de la presente invención probaron 6 para determinar la estructura genómica esperada. El curado satisfactorio dio como resultado una PCR positiva entre el conjunto de cebadores marcado como "3" en la Figura 32. De los 6 clones, 4 tuvieron escisiones correctas, 1 clon permaneció en la configuración original y otro tuvo una delección.

Estos datos demuestran la inserción iterativa de ADN en un lugar de emplazamiento genómico en un locus genómico definido utilizando los enfoques descritos anteriormente.

40 **Ejemplo 4 (ejemplo de referencia)**

El ejemplo 3 demostró que el diseño de la divulgación reivindicada era capaz de proporcionar la inserción de un vector de prueba en el genoma en una ubicación definida, en este caso el vector R21 en el locus IGH de ratón.

El uso de los medios de selección apropiados y la expresión de la recombinasa cre dieron como resultado una alteración genómica con la estructura predicha.

- 45 Los mismos elementos de diseño descritos en esta divulgación se incorporaron a los extremos 5' y 3' de un inserto BAC. Dicho inserto comprendía secuencias humanas del locus IGH y tenía aproximadamente 166 kb. Este BAC modificado genéticamente se sometió a electroporación junto con un ADN plasmídico que expresaba cre en células

ES de ratón que albergaban el lugar de emplazamiento genómico en el locus IGH de ratón. La población de células transfectadas se cultivó en medios que contenían puro para seleccionar eventos de inserción apropiados.

- Se aislaron y analizaron adicionalmente siete clones resultantes. El evento de recombinación esperado y la estructura resultante se representan en la Figura 33. Según los datos del experimento R21 descrito en el Ejemplo 3, se esperaba una selección estricta de clones correctos cuando la población transfectada se seleccionó en medios que contenían puro. Esto se debe a que la región codificante de puro requiere un elemento promotor y este es suministrado preferentemente por el lugar de emplazamiento genómico después de la recombinación. En consecuencia, la mayoría de los 7 clones aislados se habían insertado correctamente en el genoma en el lugar de emplazamiento genómico, según lo determinado por la PCR de diagnóstico. Los cebadores para diagnosticar una inserción correcta se representan en la Figura 33. Se encuentran presentes uniones correctas presentes en el genoma si se amplifica un fragmento de 610 pb entre los cebadores 'A' y 'X' y un fragmento de 478 pb se amplifica entre los cebadores 'Y' y 'B' (Figuras 33 y 34). Obsérvese que hay fragmentos amplificados entre los cebadores 'A' y '1' y los cebadores '2' y 'B', lo que indica la presencia del genoma parental (es decir, el lugar de emplazamiento genómico solo). Estos resultan de células parentales presentes internamente en las colonias celulares bajo selección con puro que escapan a la selección debido a la geometría de una colonia. Después de hacer pasar la colonia a través de medios que contienen puro, estos fragmentos de unión parentales desaparecen, lo que indica que las células parentales se eliminan de la población. Además, se demostró que todos los clones eran resistentes a 6-TG como se esperaba si el gen HPRT se inactivaba mediante el evento de inserción correcto.
- Estos datos indican que la estrategia divulgada para insertar paciones grandes de los loci de IG humana en posiciones definidas en el genoma del ratón permitirá la construcción de un ratón con una pluralidad de regiones variables de regiones de IG humana aguas arriba de las regiones constantes de ratón como se describe.

REIVINDICACIONES

1. Un roedor cuyo genoma comprende:
 - (a) una pluralidad de regiones V de IgH humana, una o más regiones D humanas y una o más regiones J humanas aguas arriba de la región constante del roedor anfitrión; y
- 5 (b) sólo una región V de cadena ligera kappa de Ig humana y una o más regiones J de cadena ligera kappa de Ig humana aguas arriba de la región constante kappa del roedor anfitrión,

en donde el roedor es capaz de producir un repertorio de anticuerpos químéricos que tienen una región constante de roedor y una región variable humana;

en donde el roedor es homocigoto en uno o ambos del locus (a) o el locus (b).
- 10 2. Un roedor según la reivindicación 1, en donde el roedor es un ratón.
3. Un roedor según cualquier reivindicación anterior, en donde el ADN de cadena pesada humana comprende al menos 50% de los genes variables (V) de la cadena pesada humana, tales como al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o todos los genes variables (V) de cadena pesada humana.
- 15 4. Un roedor según cualquier reivindicación anterior, en donde la región constante de cadena pesada es la región constante de tipo salvaje del anfitrión endógeno ubicada en el locus de tipo salvaje.
5. Un roedor según cualquier reivindicación anterior, en donde la región constante de la cadena ligera kappa del roedor anfitrión es la región constante de la cadena ligera kappa de tipo salvaje del anfitrión endógeno ubicada en el locus de la cadena ligera kappa de tipo salvaje.
- 20 6. Un método para producir un anticuerpo o cadena de anticuerpo químéricos específicos para un antígeno deseado, comprendiendo el método inmunizar un roedor según cualquier reivindicación anterior con el antígeno y recuperar el anticuerpo o la cadena de anticuerpo.
7. El método de la reivindicación 6, en donde el anticuerpo o la cadena de anticuerpo químéricos se manipulan, opcionalmente a nivel de ADN, para generar moléculas con propiedades o estructura similares a los anticuerpos seleccionadas entre:
 - 25 un anticuerpo de dominio; o
 - una región variable humana con cualquier región constante de cadena pesada o ligera de la misma o diferente especie; o
 - una región variable humana junto con cualquier otro compañero de fusión.
- 30 8. Un método para producir un anticuerpo completamente humanizado, comprendiendo el método inmunizar un roedor según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 con un antígeno, y después reemplazar la región constante de roedor del anticuerpo químérico específicamente reactivo con el antígeno por una región constante humana, opcionalmente mediante modificación genética del ácido nucleico que codifica el anticuerpo.
- 35 9. Un método para preparar una composición farmacéutica, comprendiendo el método producir un anticuerpo según el método de la reivindicación 8 y comprendiendo adicionalmente combinar el anticuerpo con un portador u otro excipiente farmacéuticamente aceptables para producir la composición.
10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 40 11. Un método para producir un anticuerpo o cadena de anticuerpo químéricos o completamente humanizados, comprendiendo el método llevar a cabo el método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 o 10, y expresar el anticuerpo o cadena de anticuerpo.
12. Un método para elaborar una composición farmacéutica, comprendiendo el método llevar a cabo el método para producir un anticuerpo o cadena de anticuerpo químéricos o completamente humanizados según la reivindicación 11,

y que comprende adicionalmente formular el anticuerpo o cadena de anticuerpo con un portador u otro excipiente farmacéuticamente aceptables.

Tres cadenas principales de vectores básicos

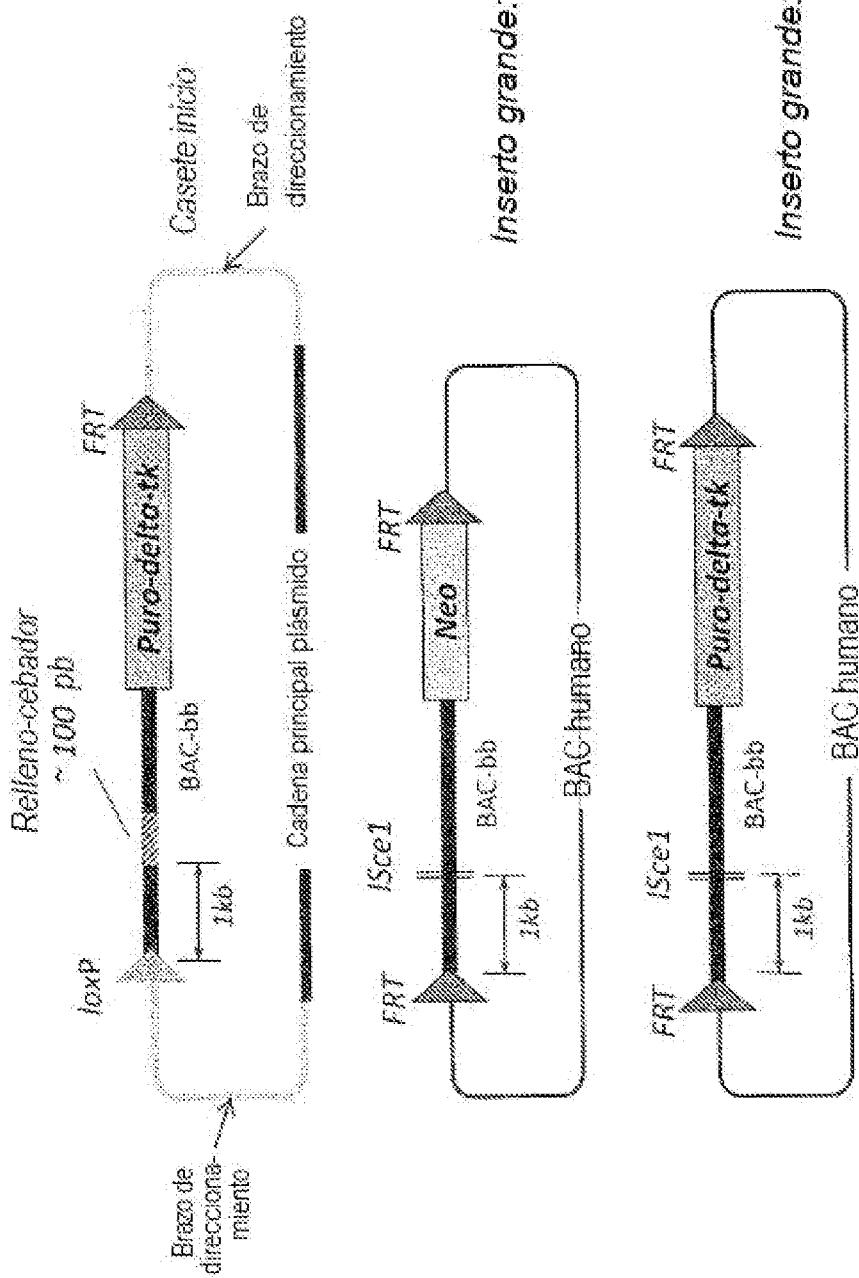
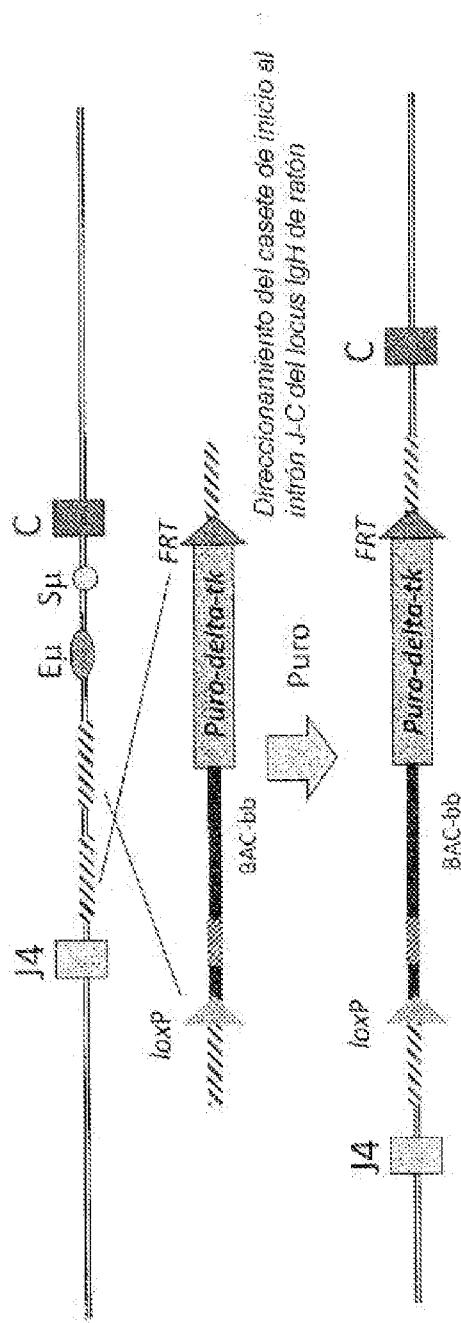


Fig. 1

Vector de Entrada / Inicio: Etapa 1



Validación:

1. LR PCR de direccionamiento génico convencional/Southern
2. Elabxación de quimeras y reproducción de quimeras en paralelo con la siguiente etapa

Fig. 2

Vector de adición: Etapa 2

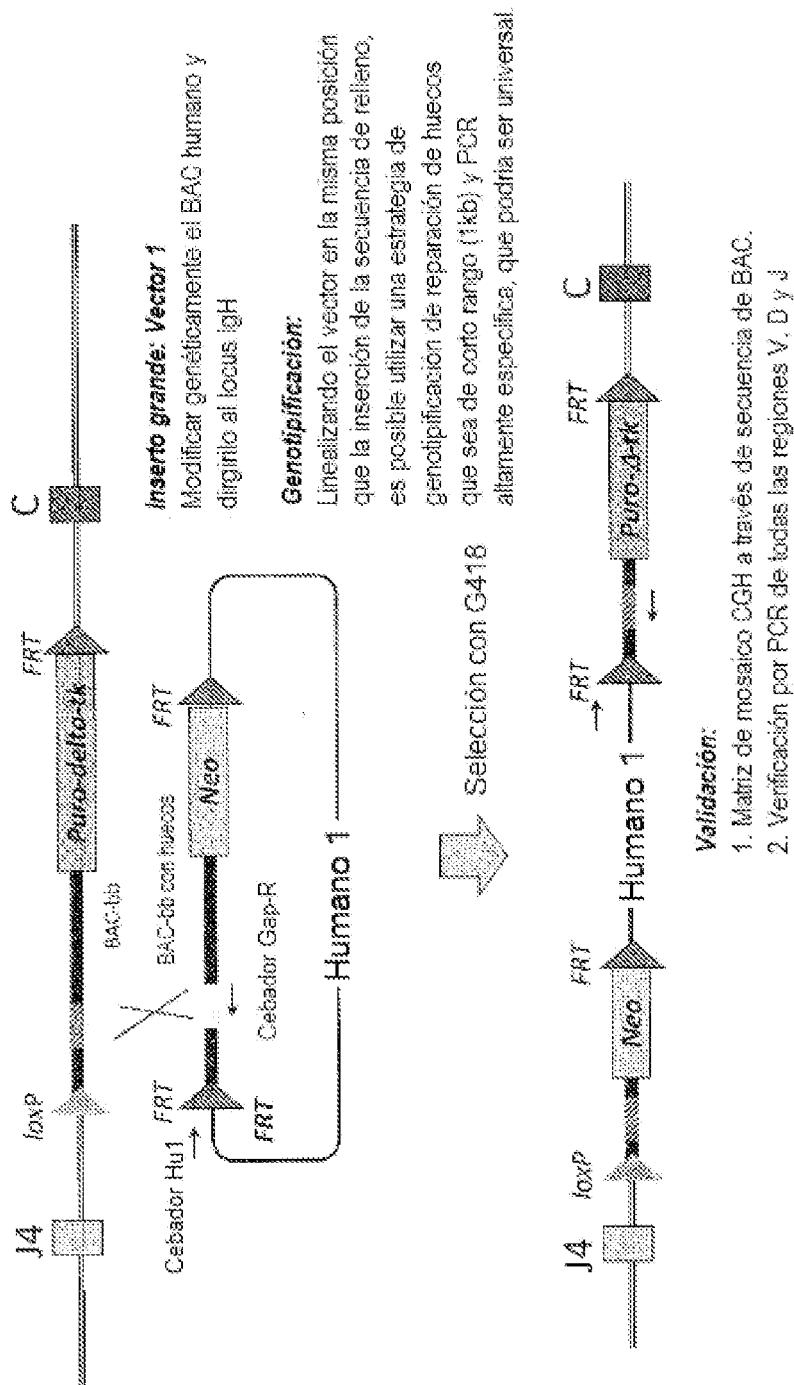


Fig. 3

Vector de adición: Etapa 2

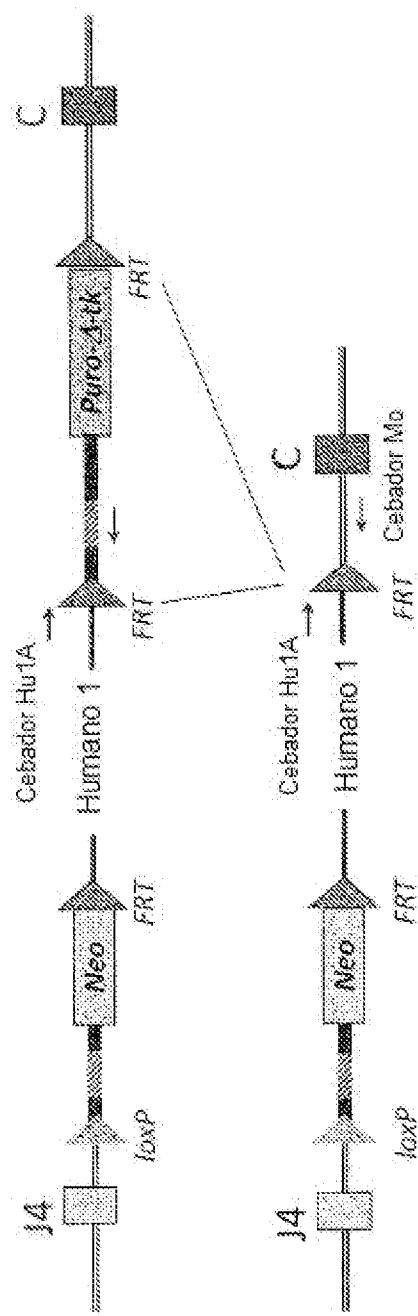


Fig. 4

Vector de adición: Etapa 3A

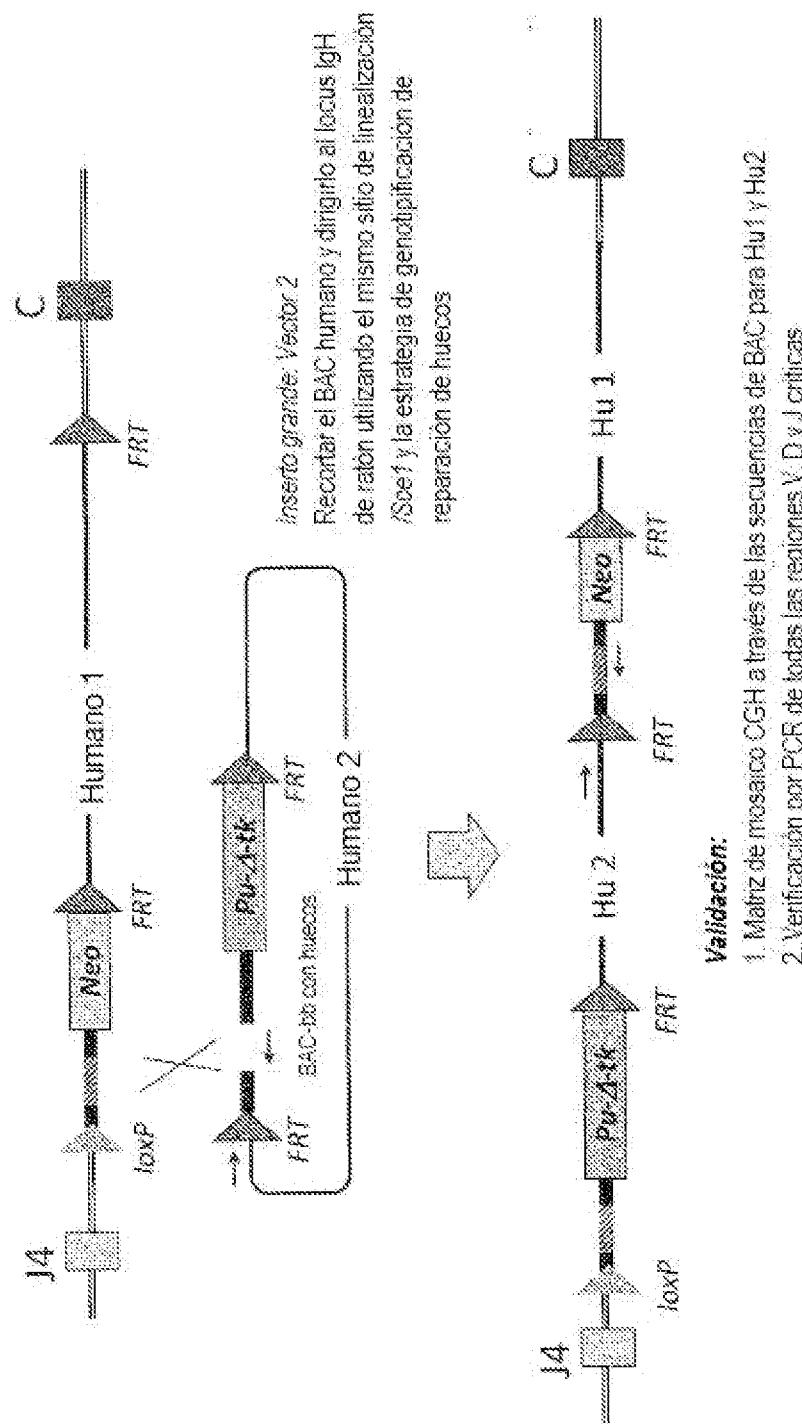


Fig. 5

Vector de adición: Etapa 3B

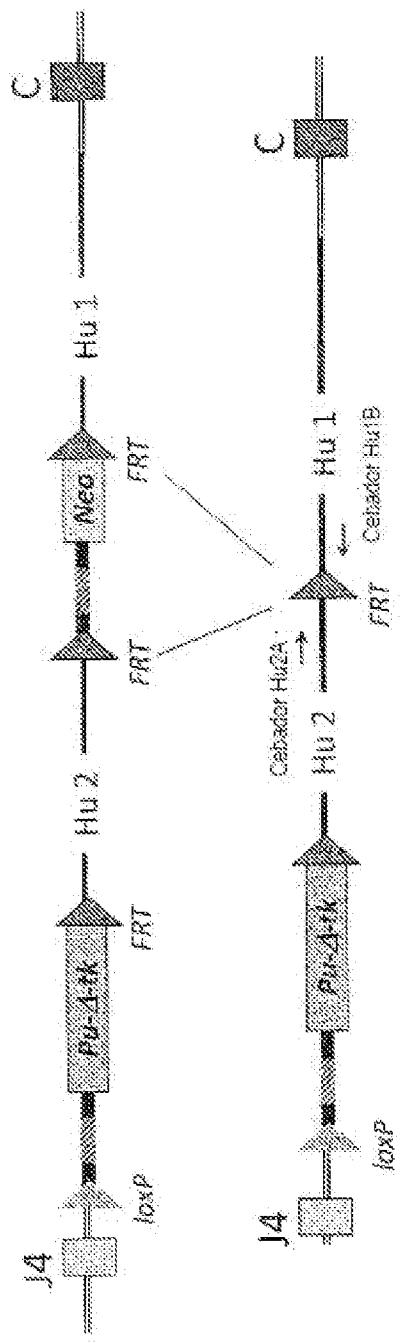


Fig. 6

Vector de adición: Etapa 4

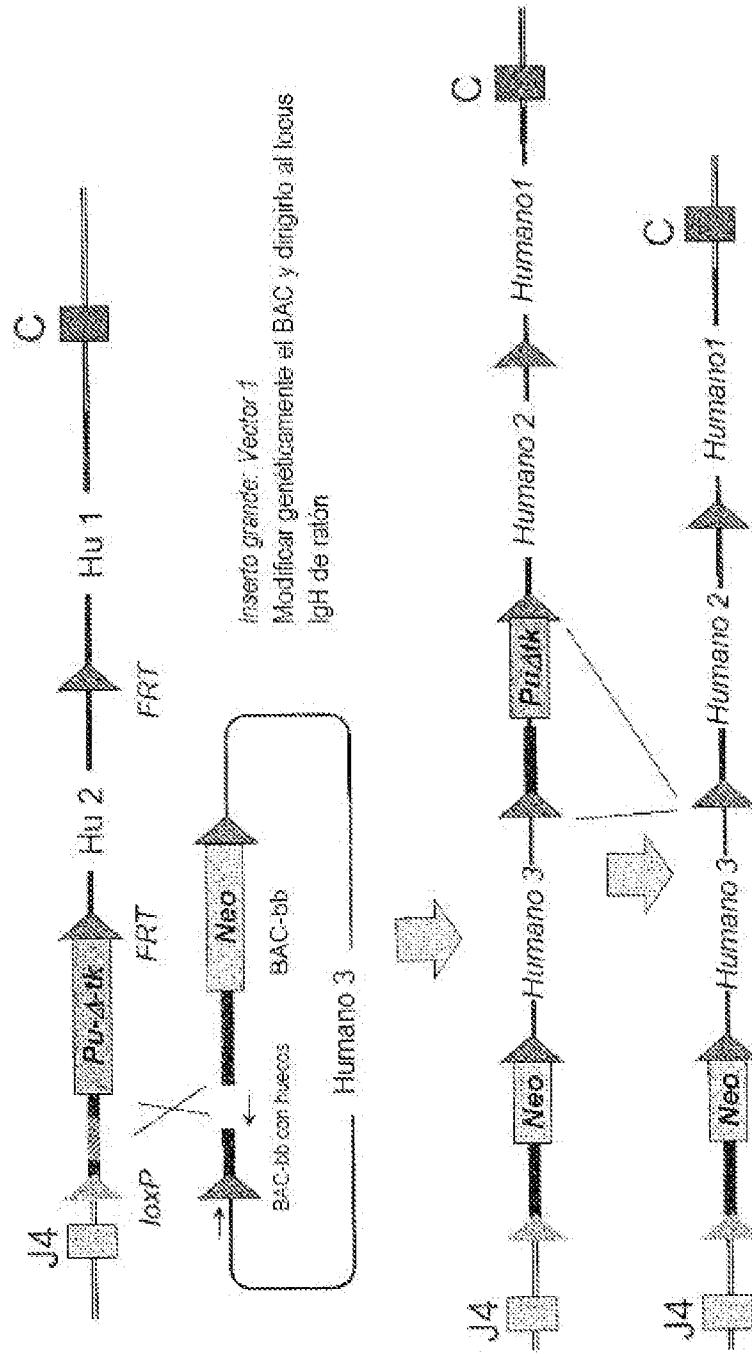


Fig. 7

Un locus *Igh* de ratón humanizado

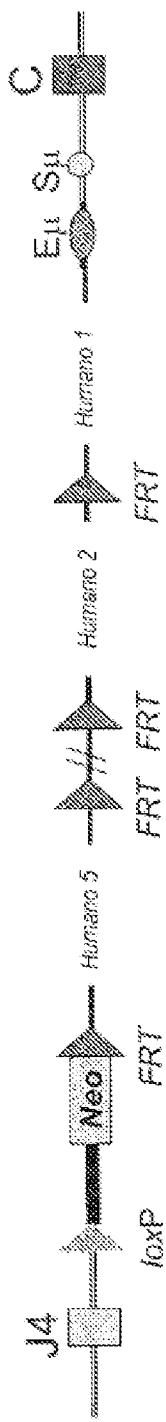


Fig. 8

Lugar de emplazamiento genómico de BAC insertado
en el locus IgH

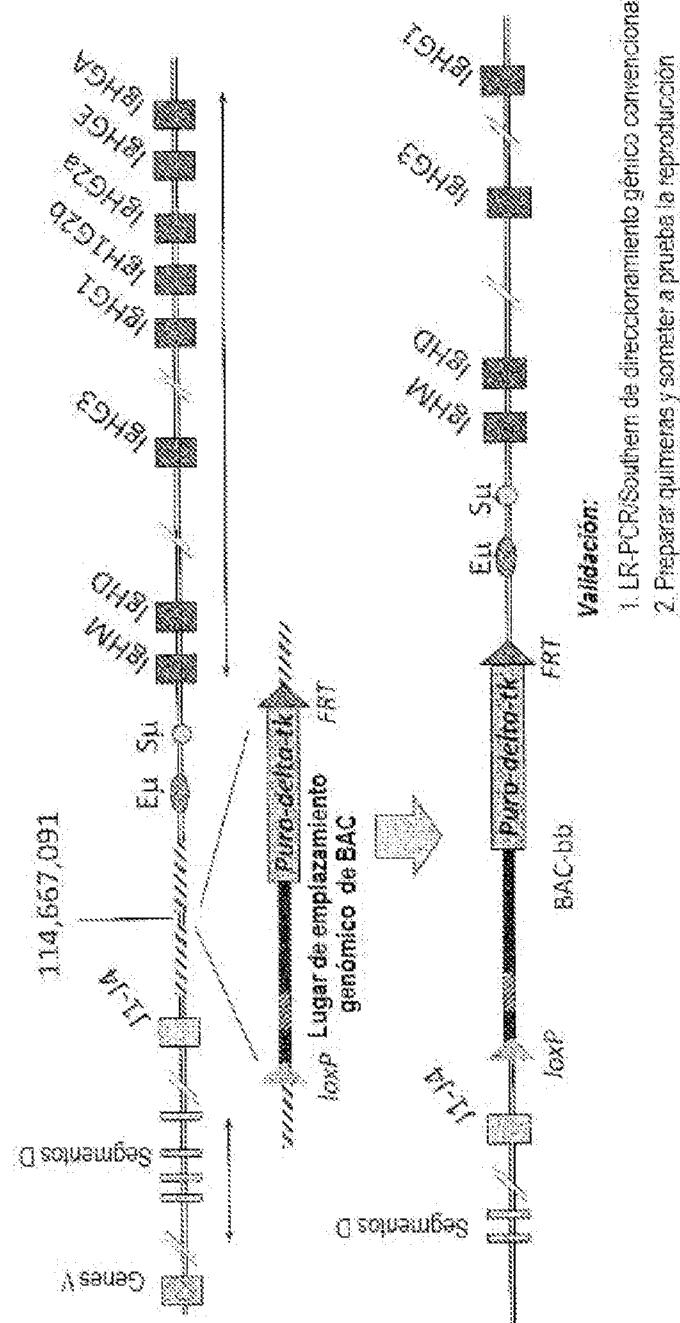
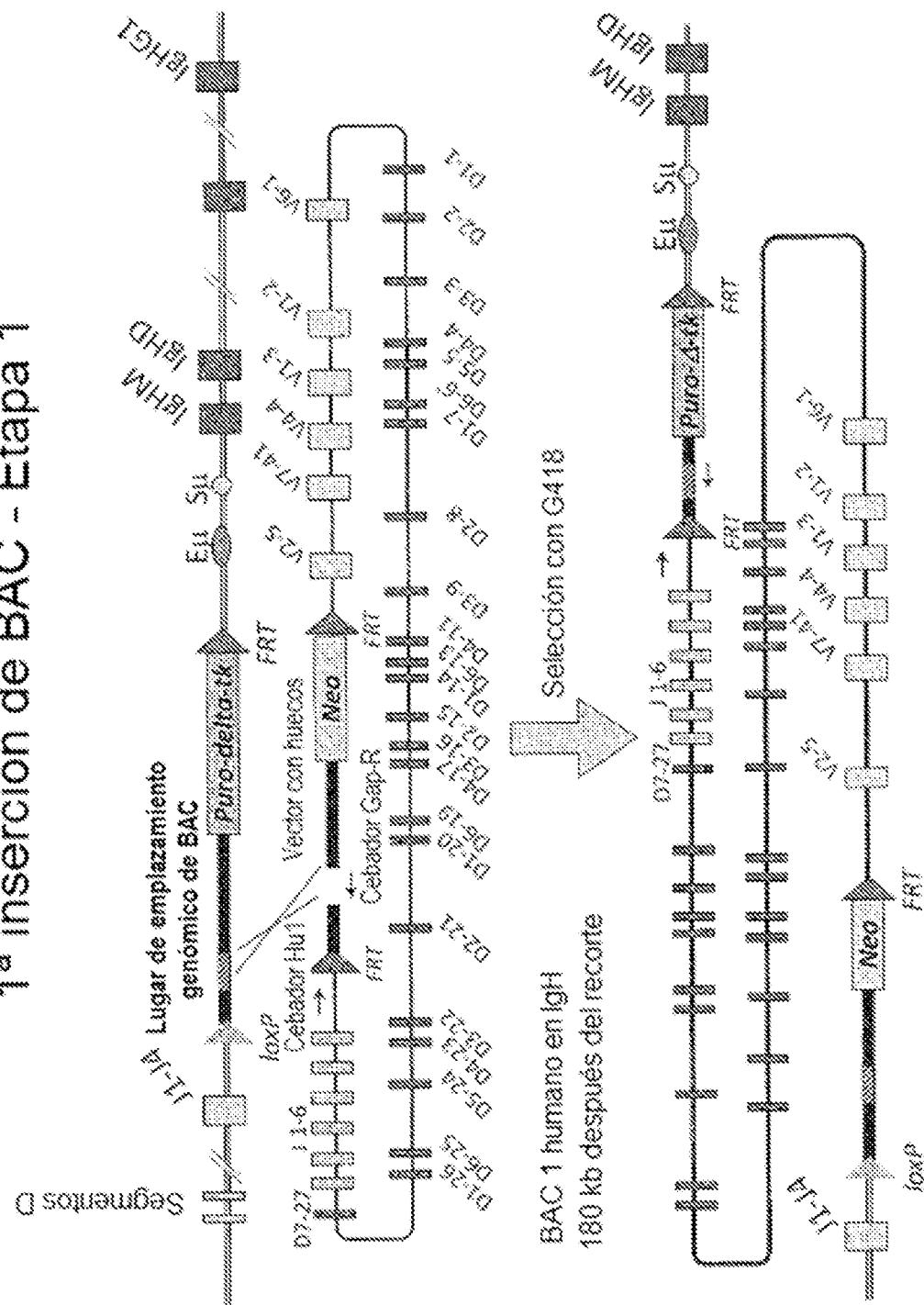


Fig. 9

1a inserción de BAC - Etapa 1



9

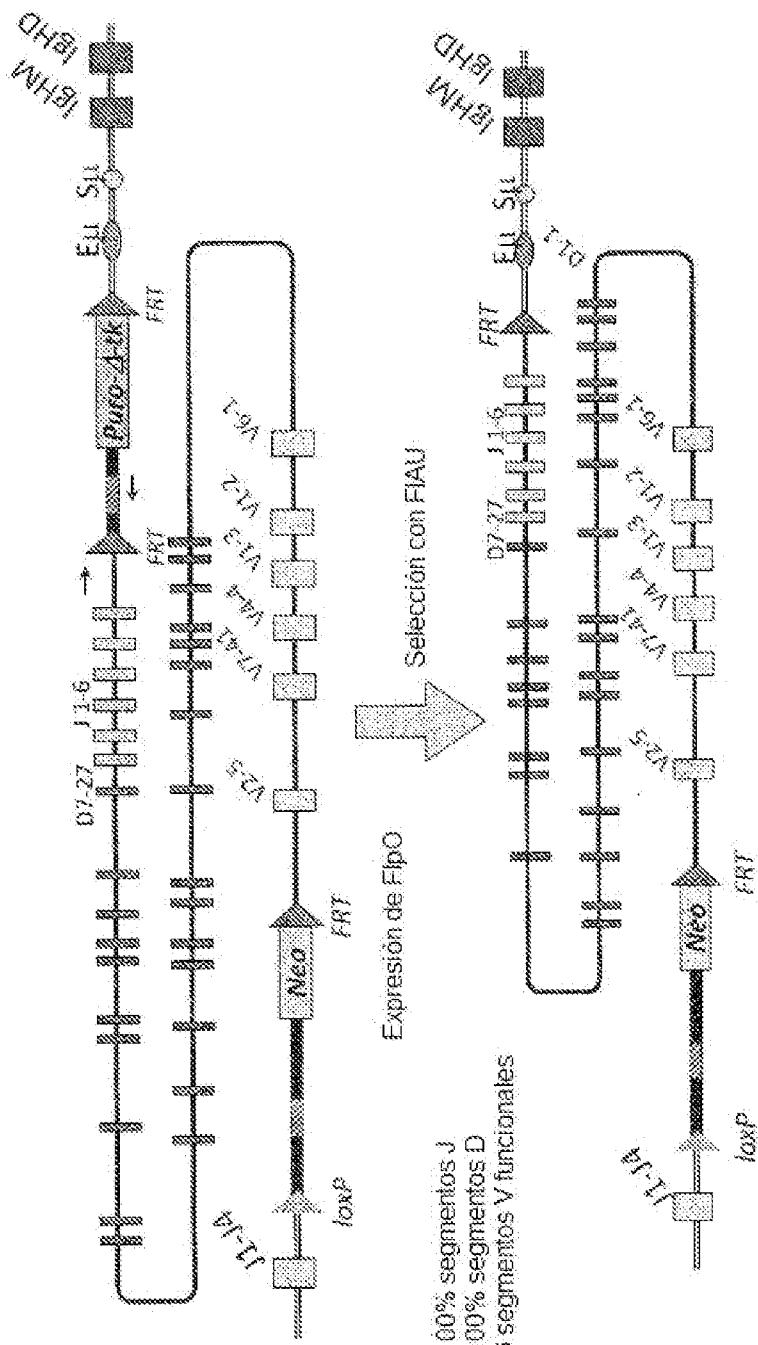
1^a inserción de BAC - Etapa 2

Fig. 11

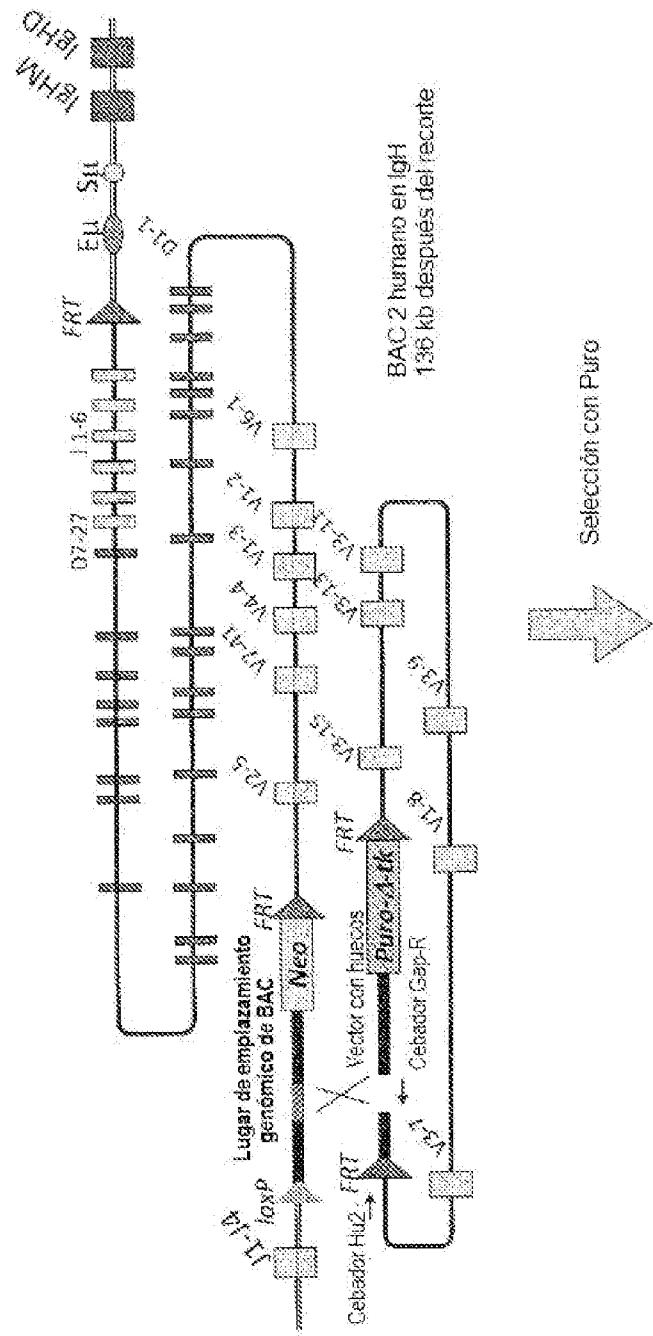
2^a inserción de BAC - Etapa 3

Fig. 12

2a inserción de BAC - Etapa 4

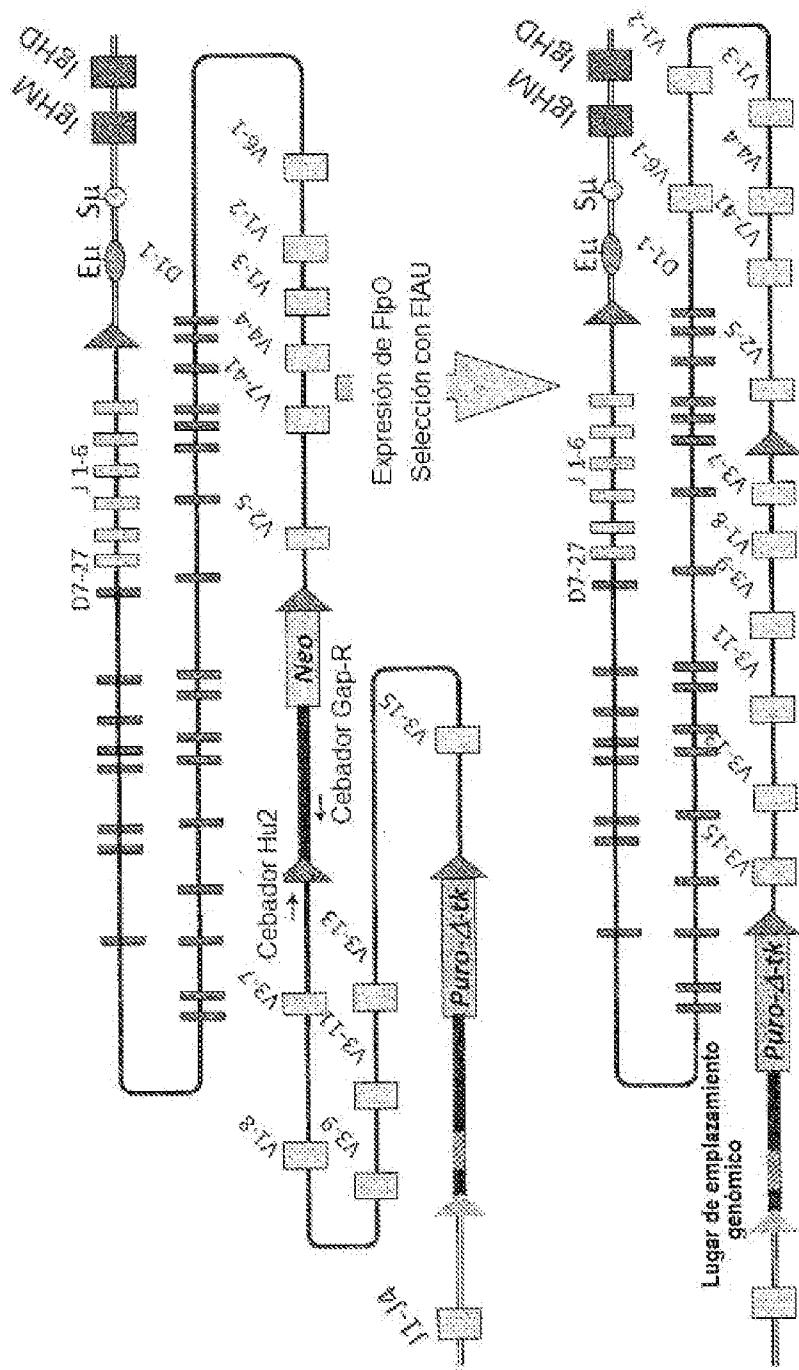


Fig. 13

Lugar de emplazamiento genómico de BAC en el locus IgK

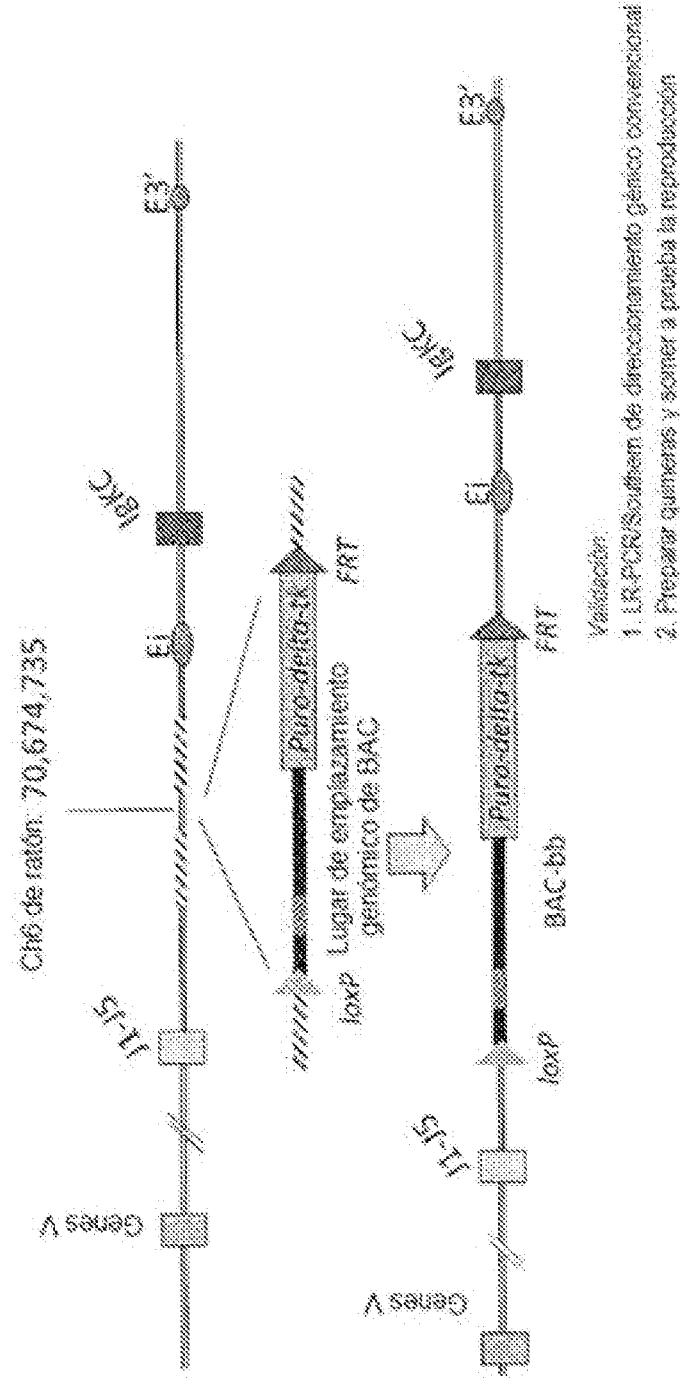


Fig. 14

1^a inserción de BAC - Etapa 1

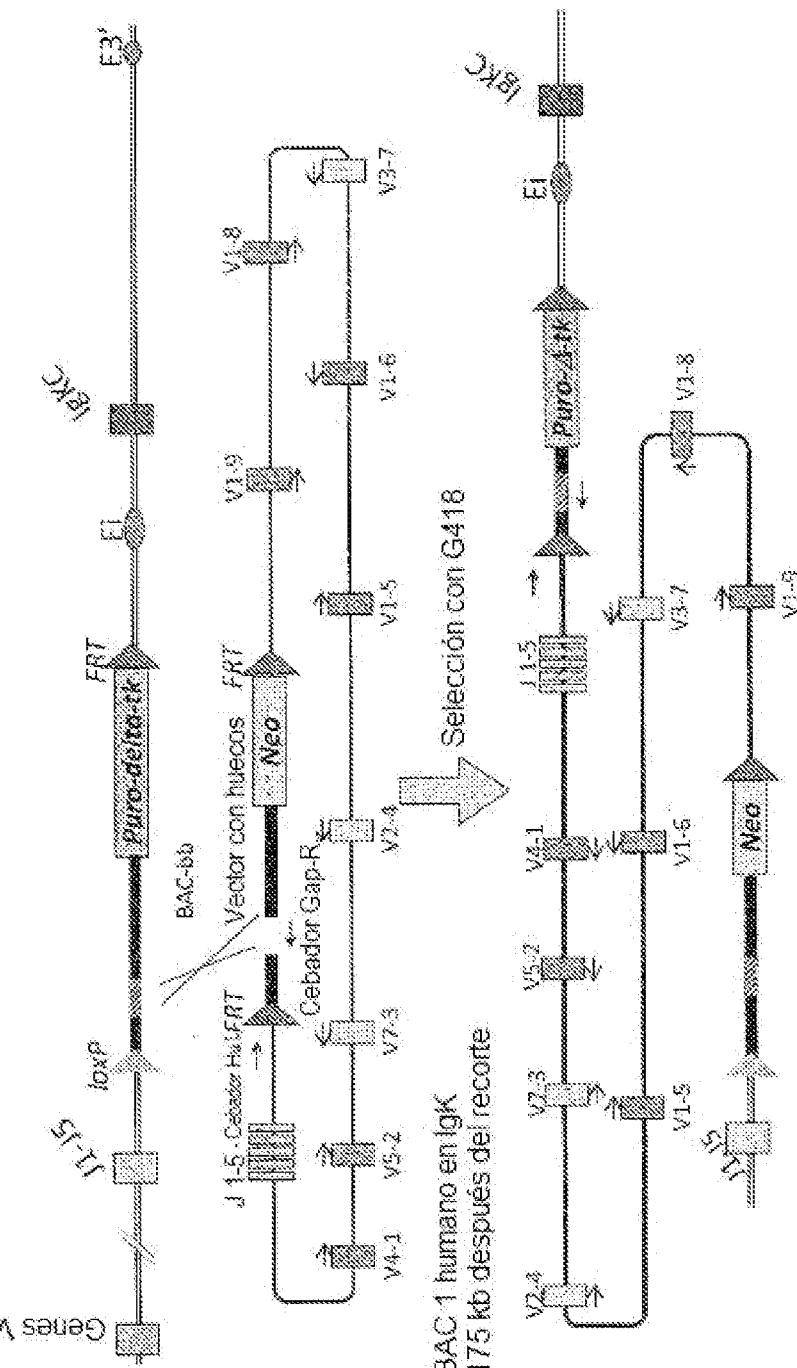


Fig. 15

1a inserción de BAC - Etapa 2

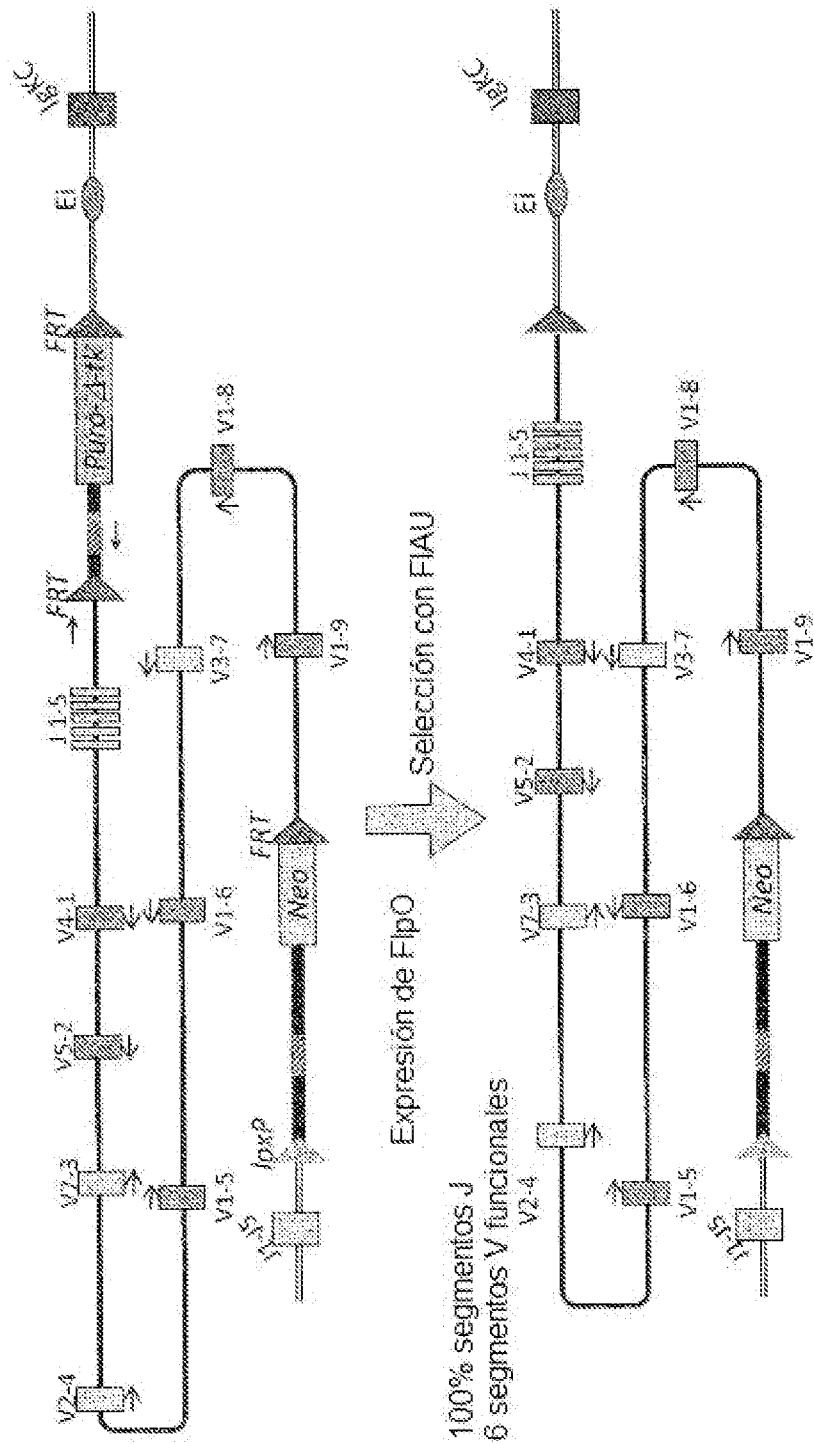


Fig. 16

2^a Inserción de BAC - Etapa 3

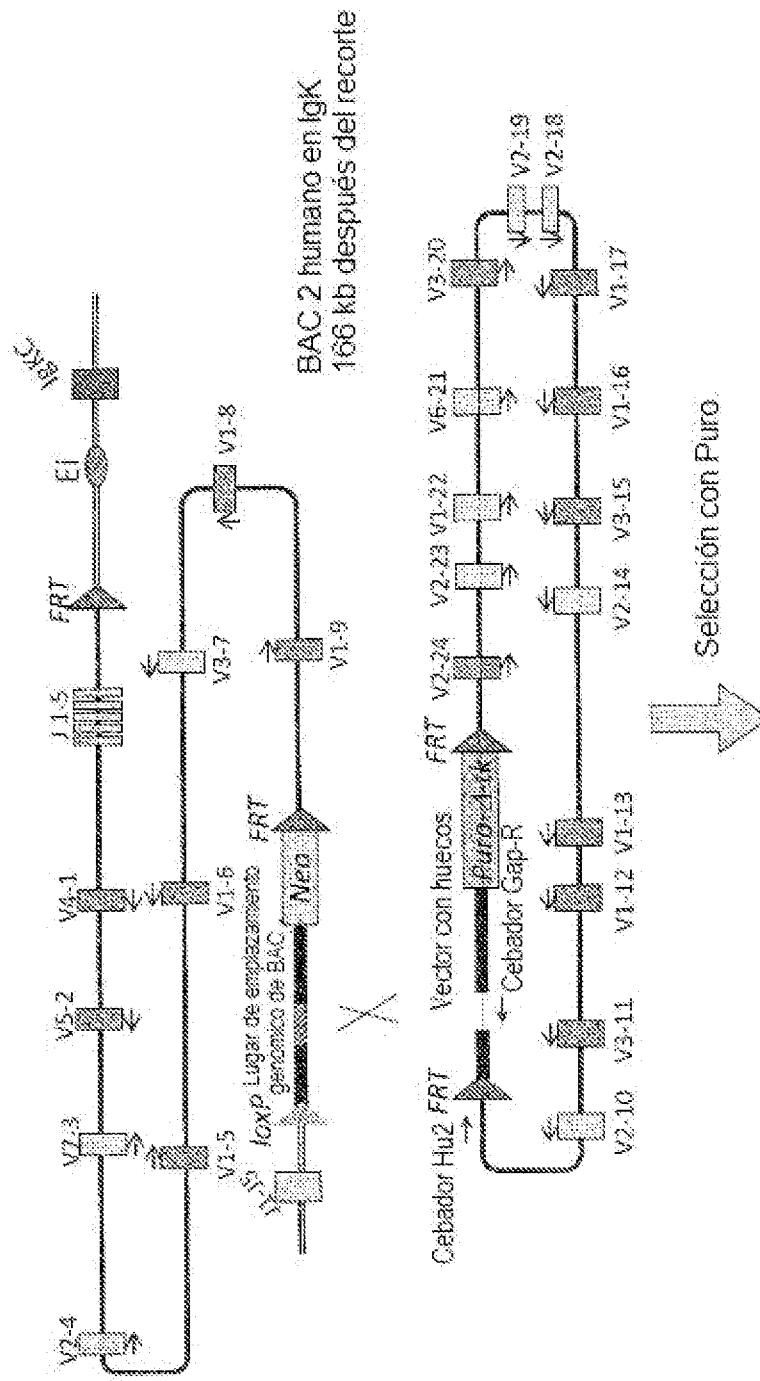


Fig. 27

2^a inserción de BAC - Etapa 4

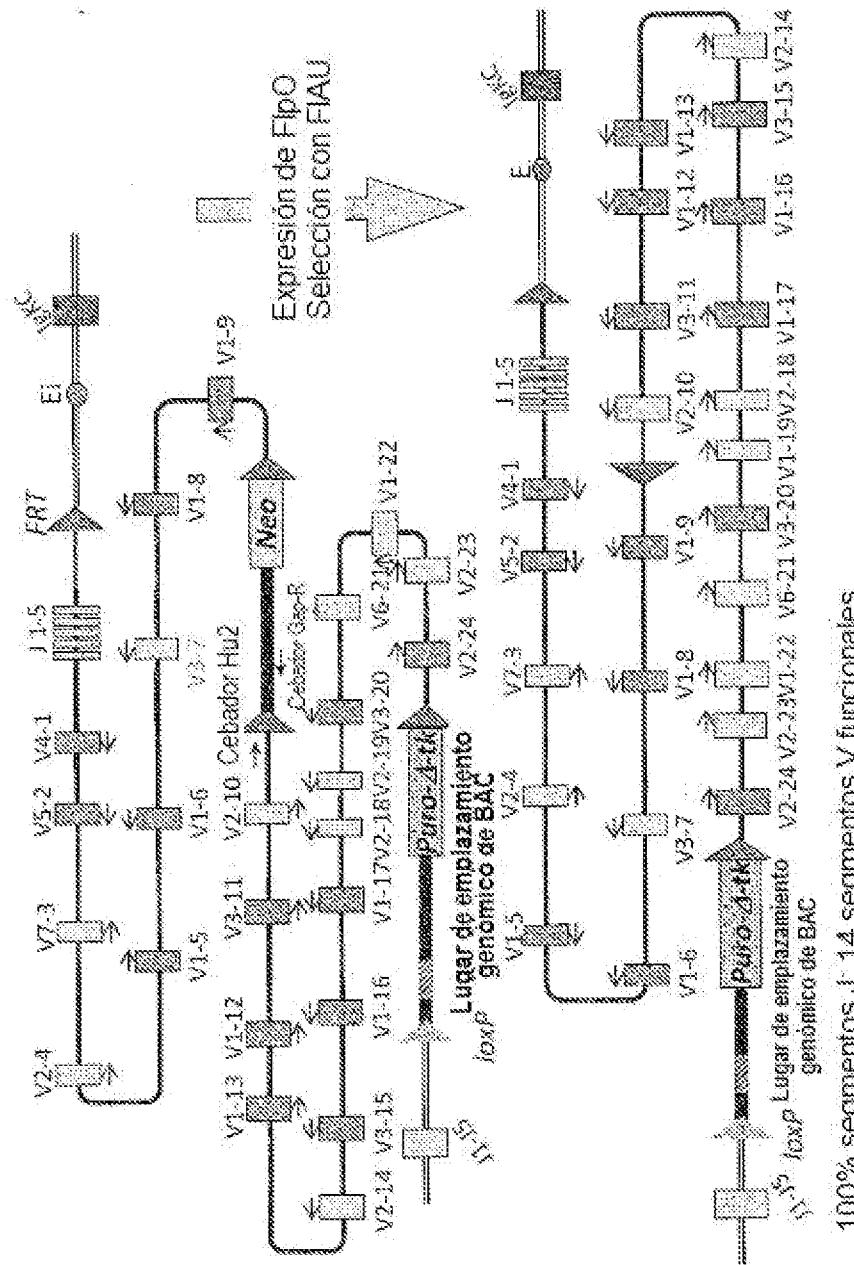


Fig. 18

100% segmentos J, 14 segmentos V funcionales

Prueba rápida de Células ES con loci IgH e IgK humanizados

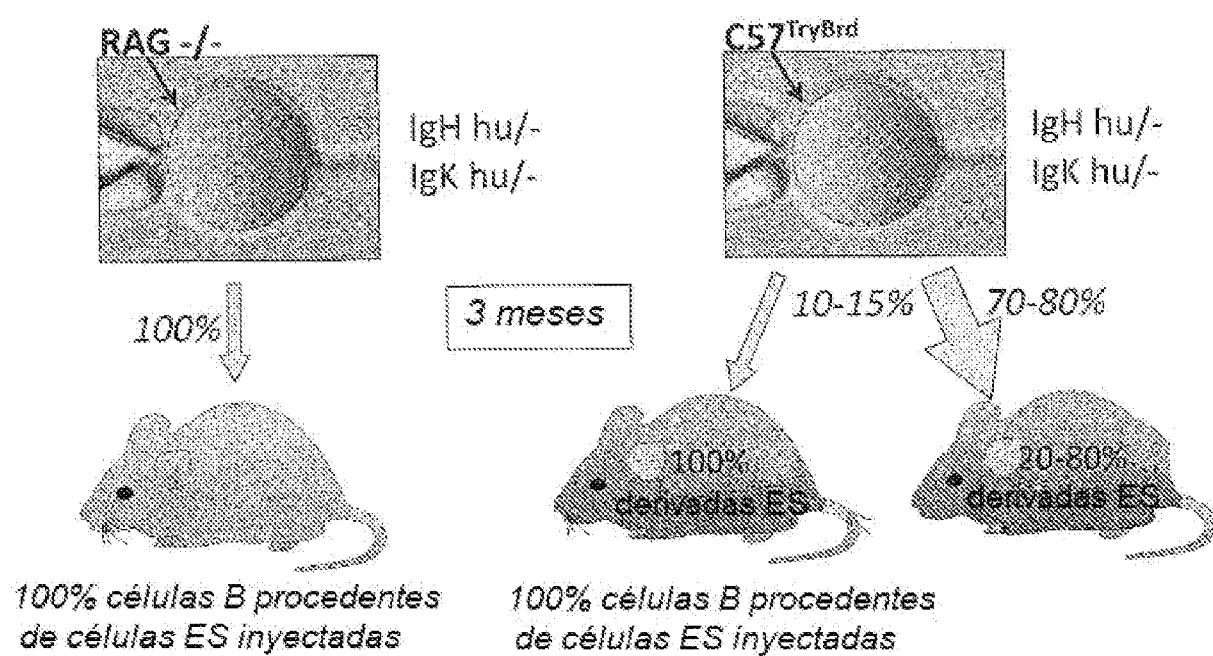


Fig. 19

Generación de anticuerpos en ratones quiméricos con loci IgH e IgK humanizados

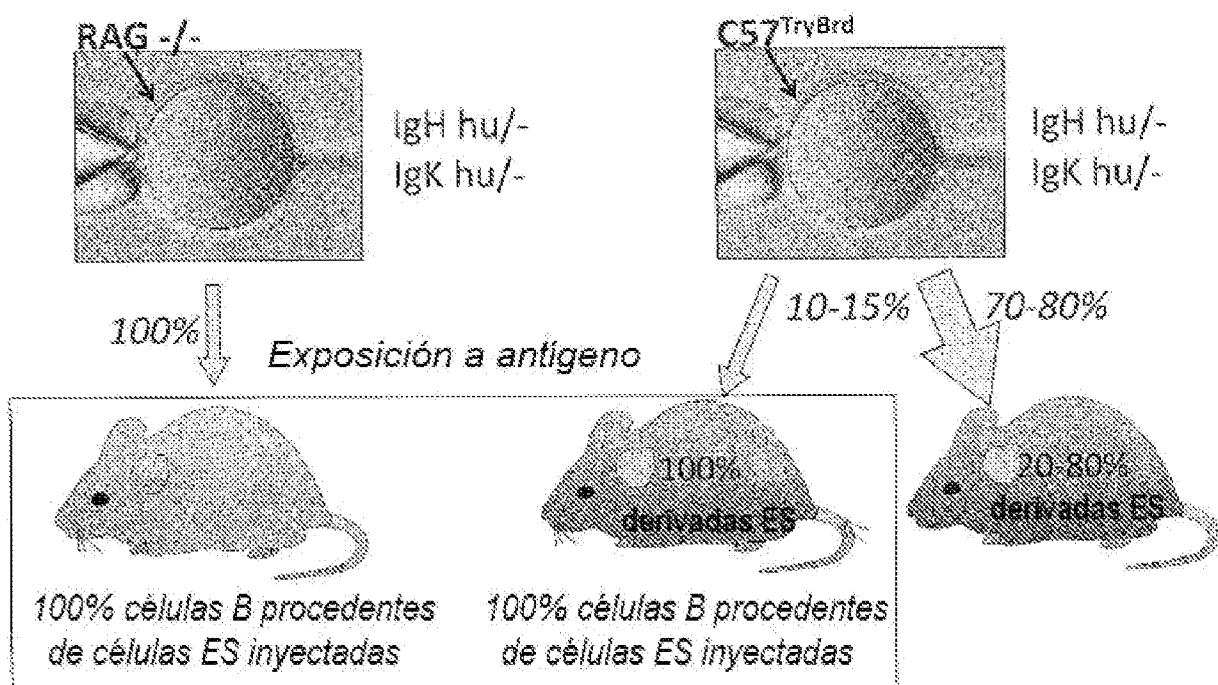


Fig. 20

ES 2 978 496 T3

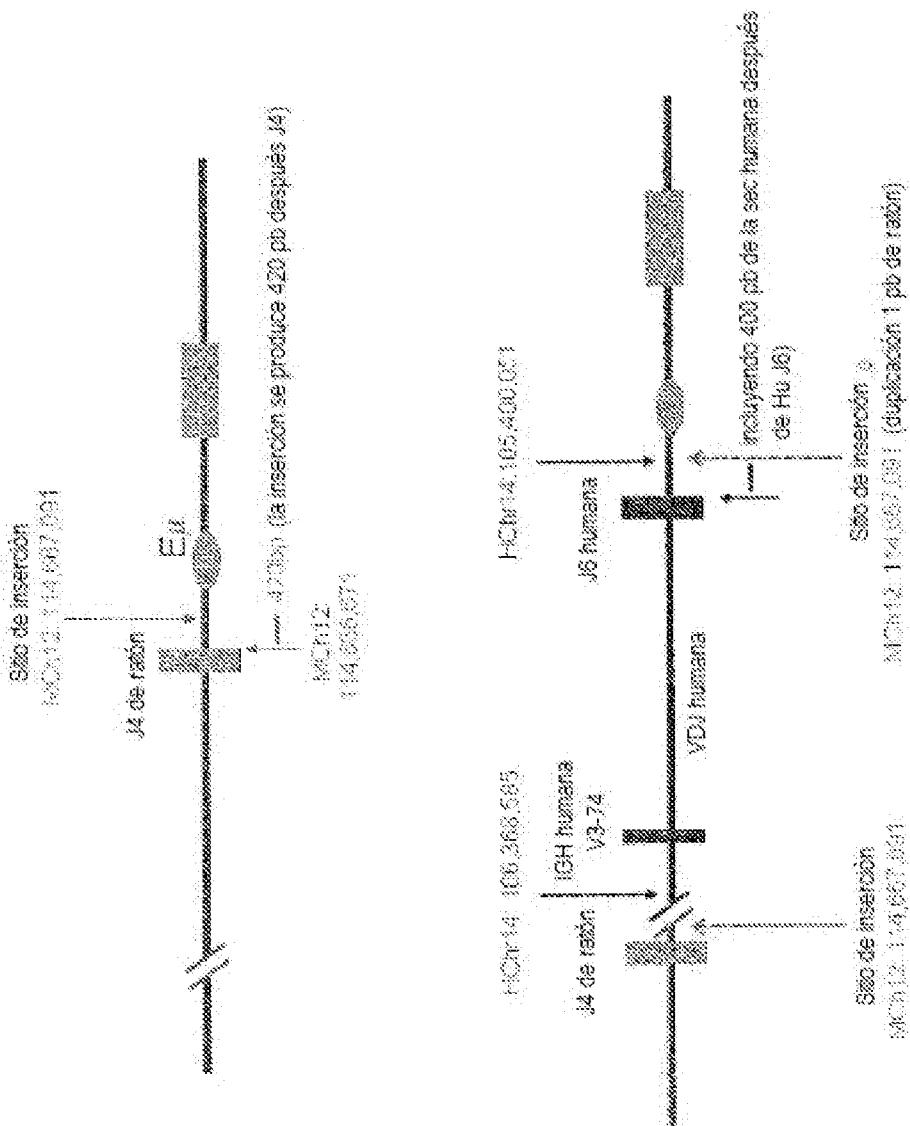


Fig. 21

Direcccionamiento del Lugar de Emplazamiento Genómico

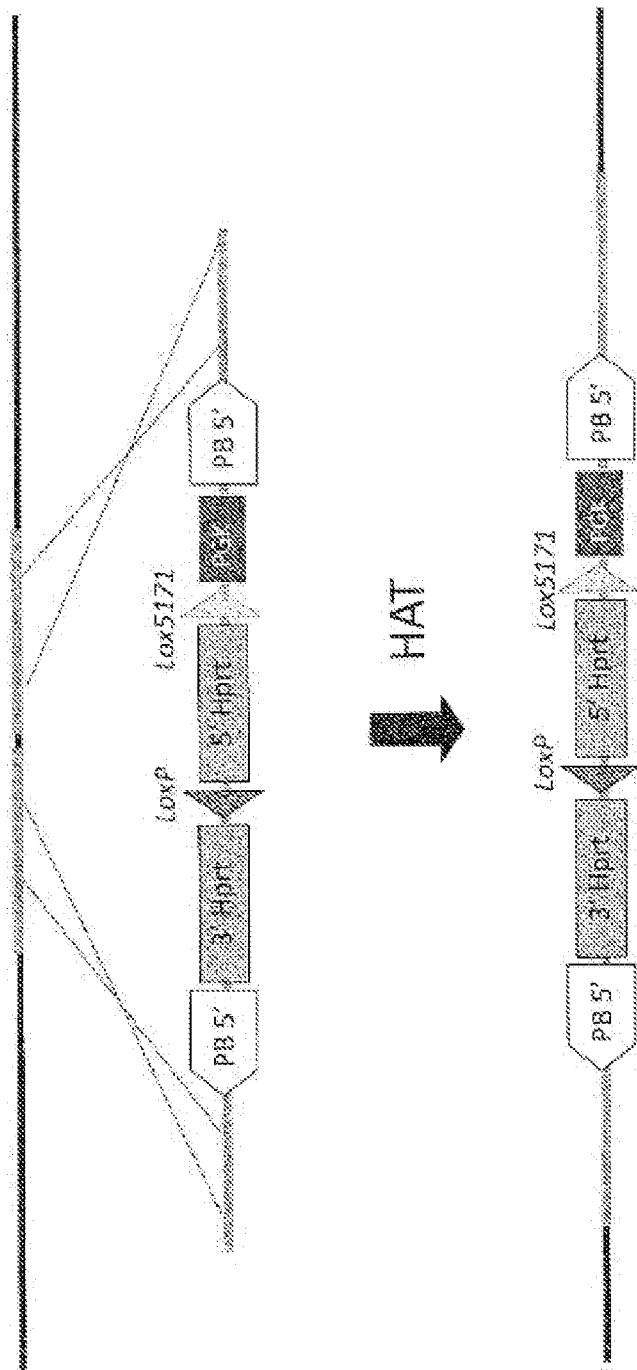


FIG. 22

Inserción del 1^{er} BAC

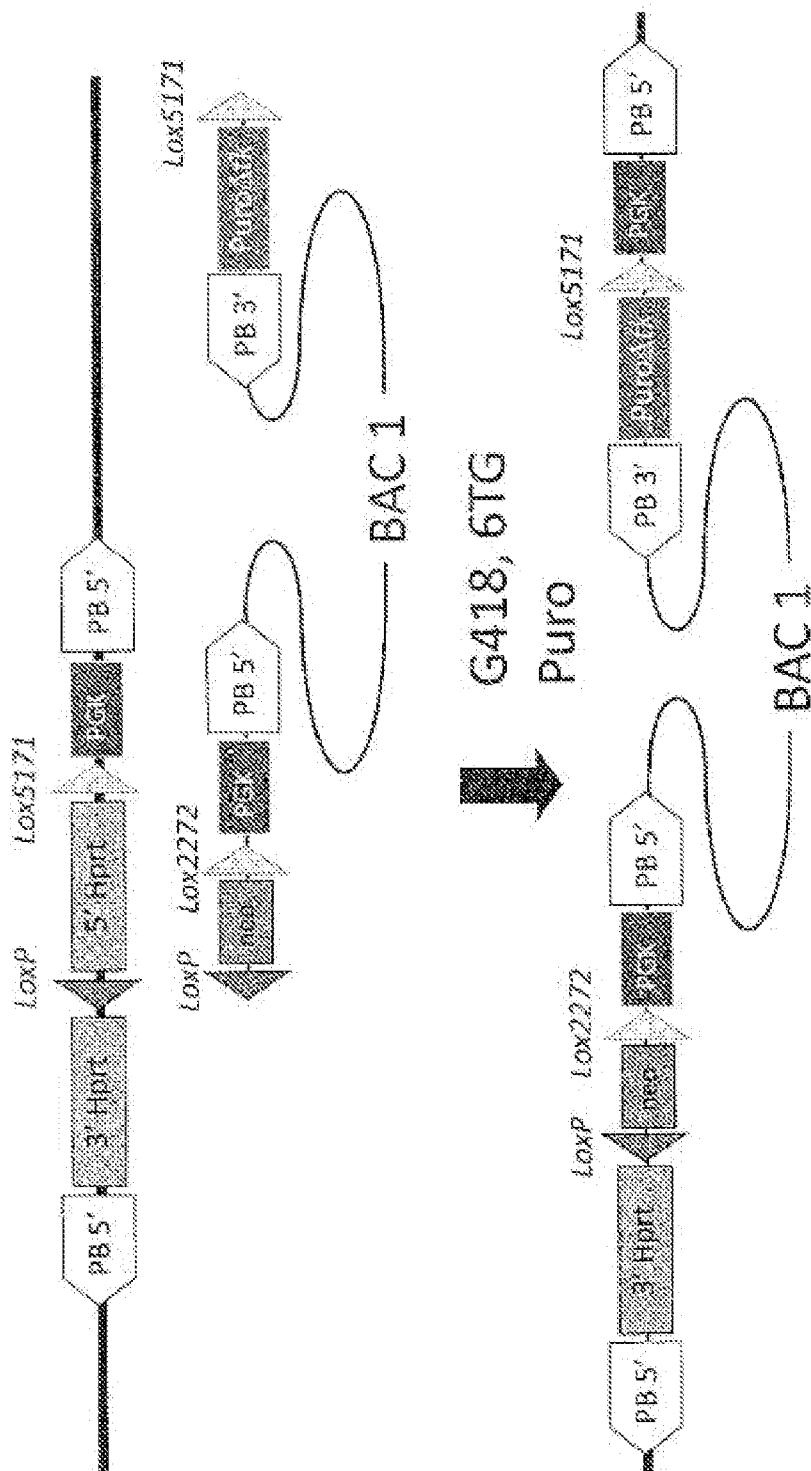


Fig. 23

Curado de la modificación 3'

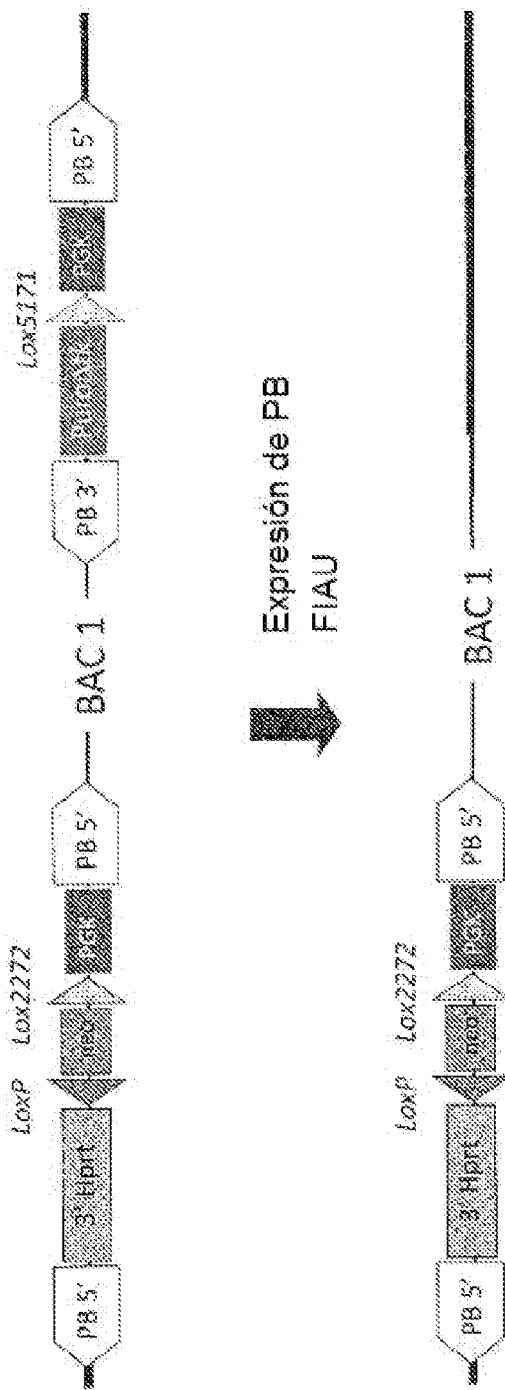


Fig. 24

Inserción del 2º BAC

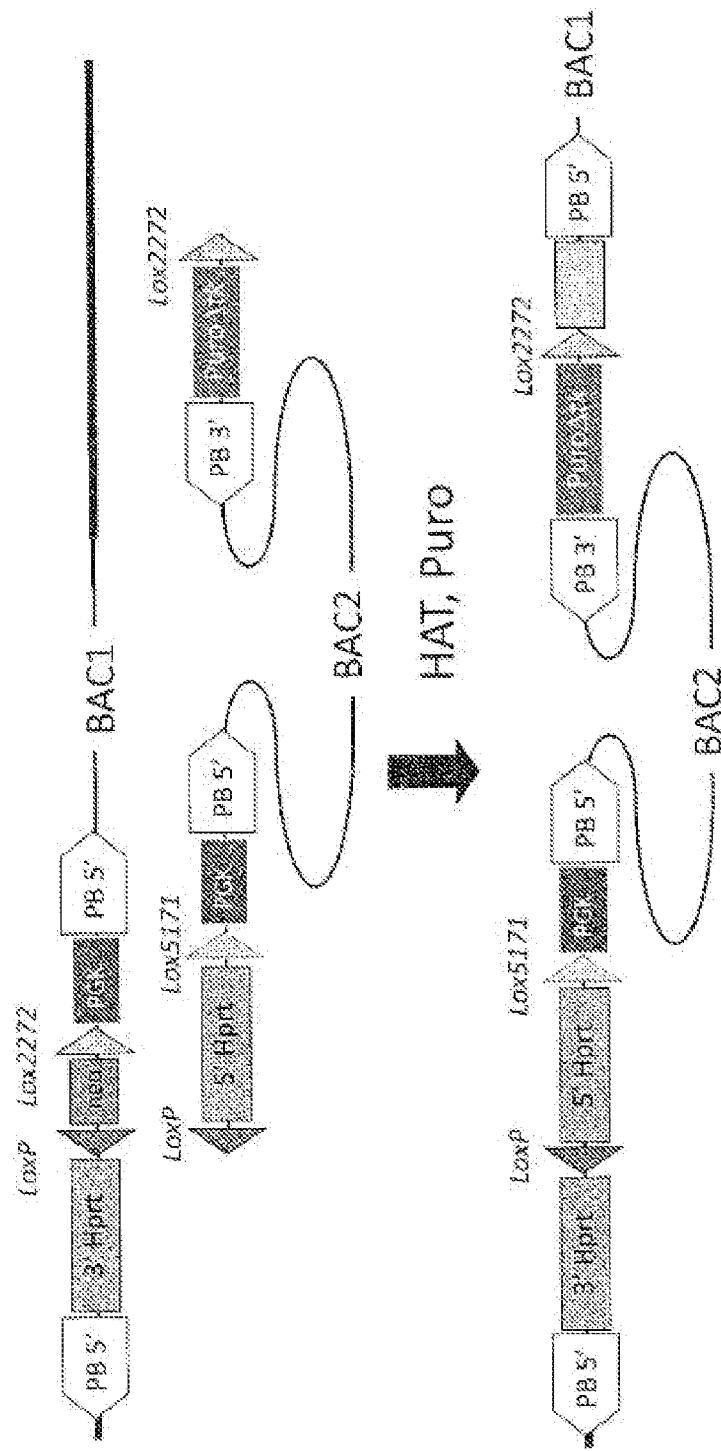


Fig. 23

Eliminación de la modificación 3'

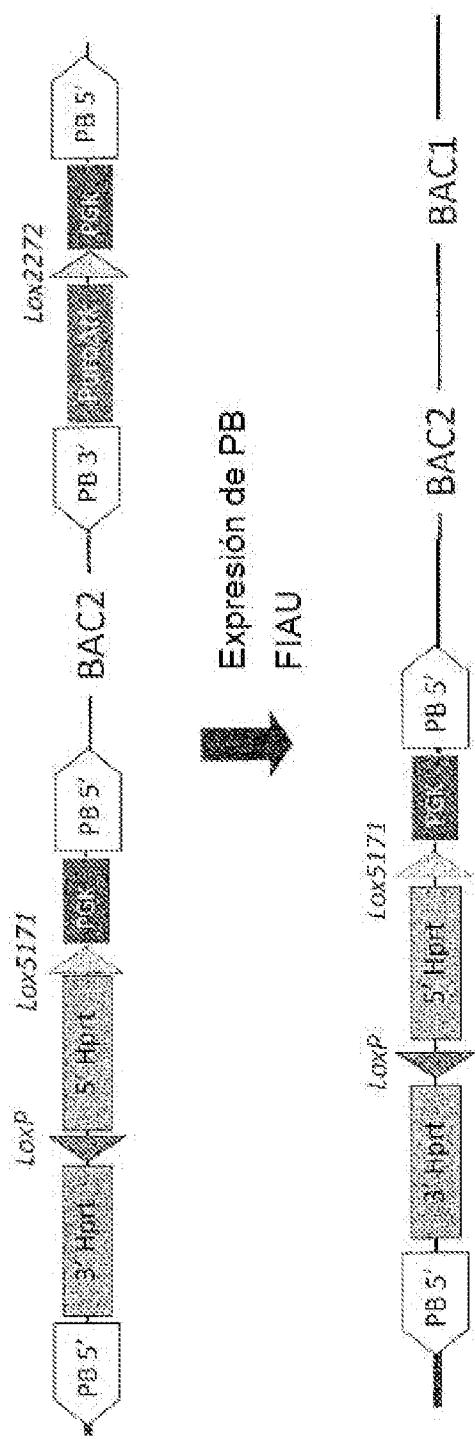


Fig. 26

Direccionamiento del vector de "Volteo"

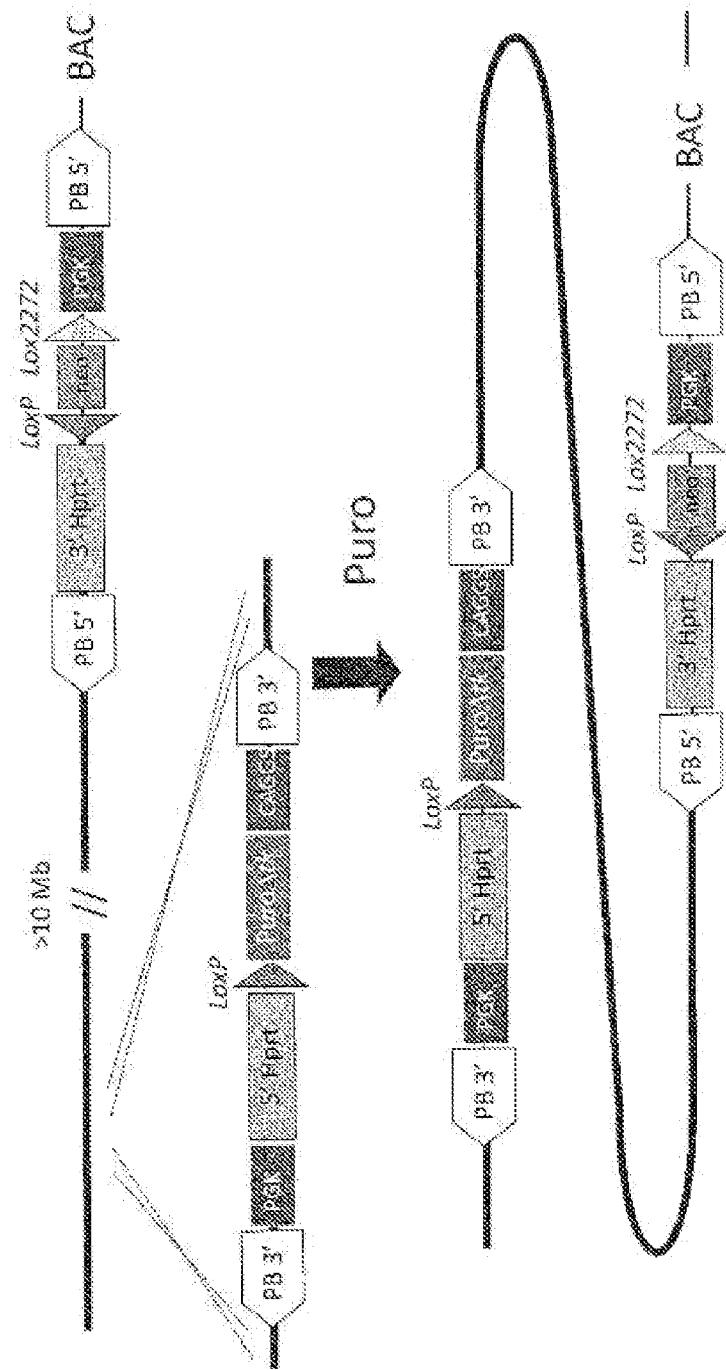


Fig. 27

Inversión

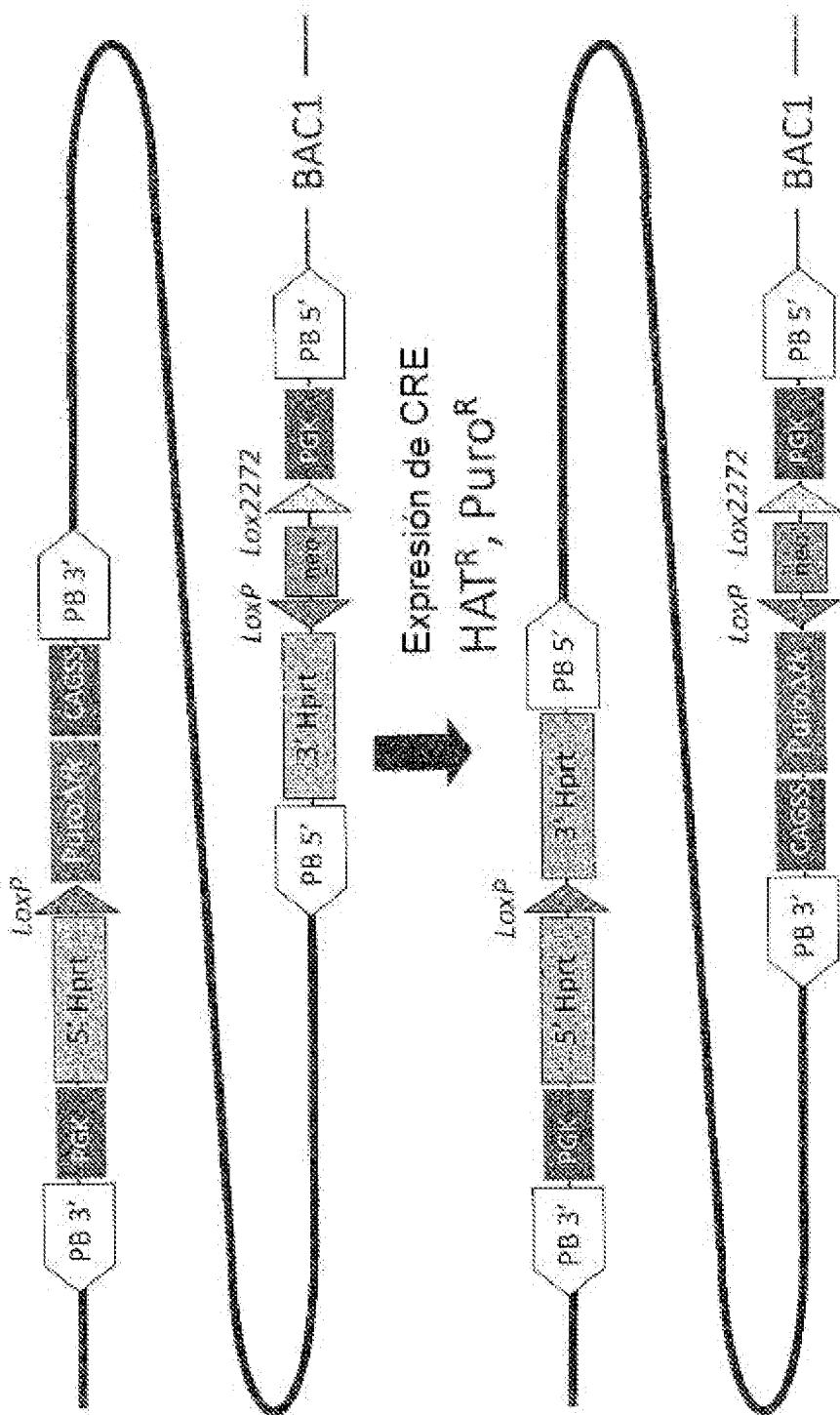


Fig. 28

Eliminación de todas las modificaciones

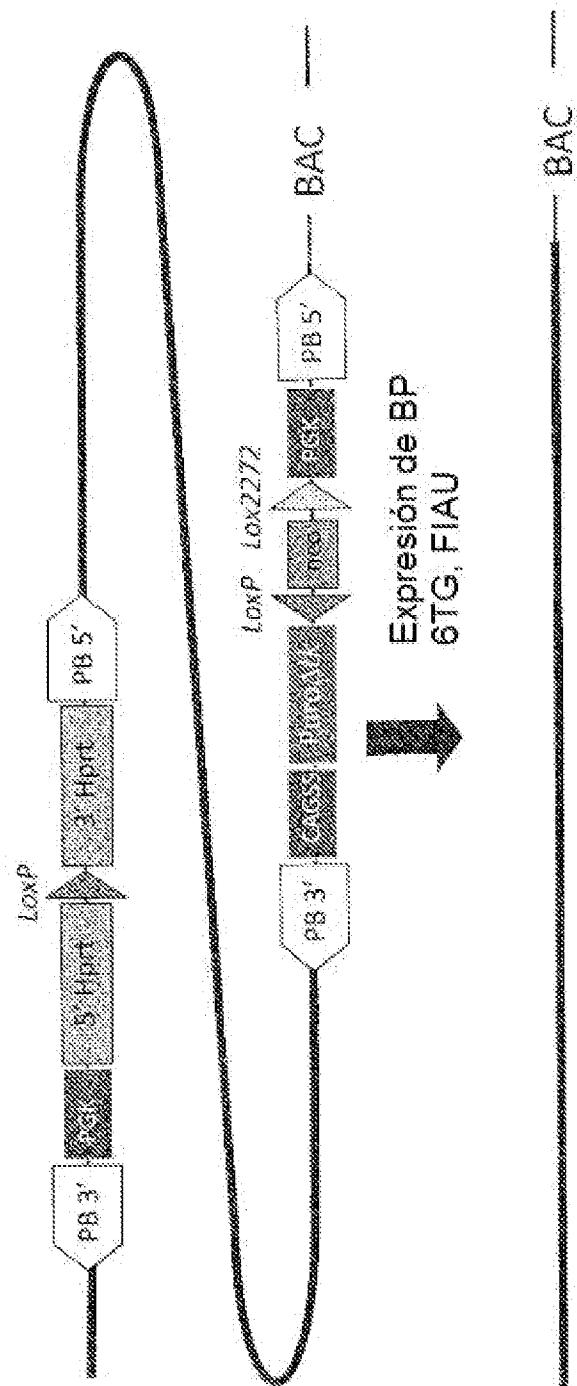
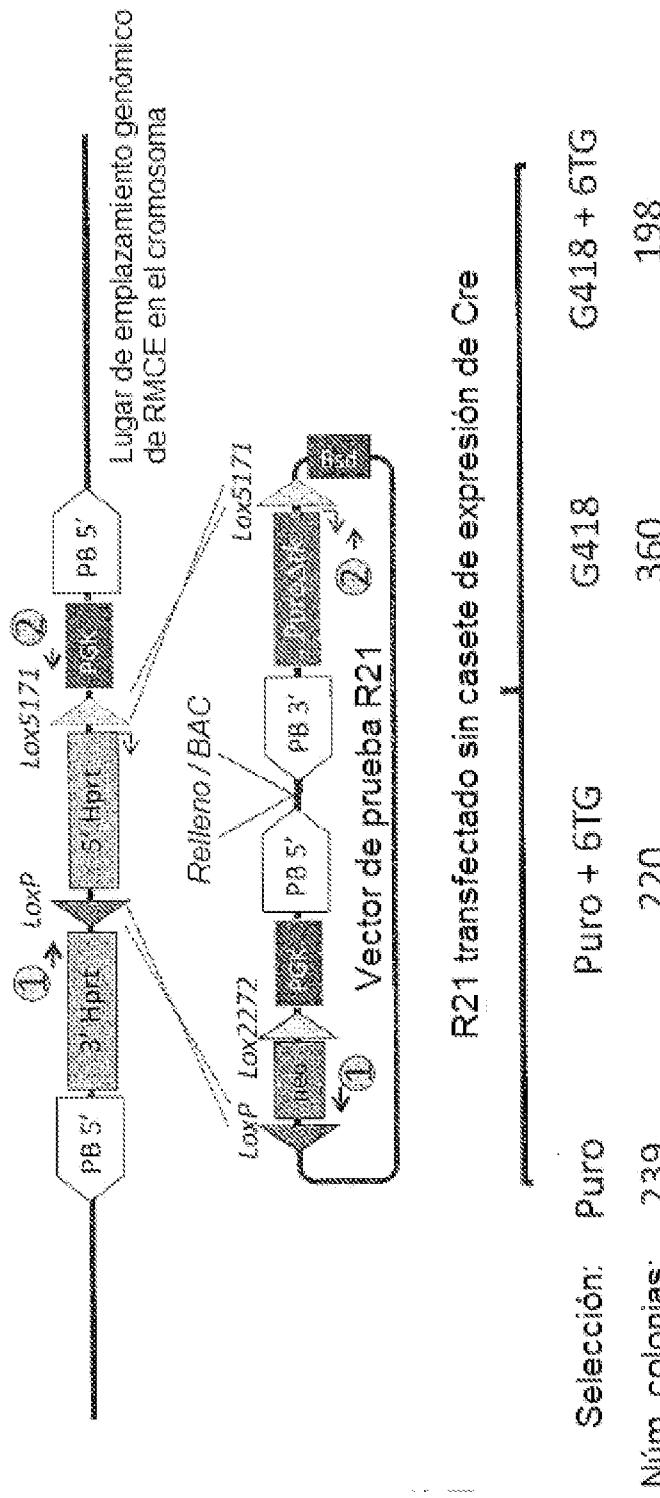


Fig. 29

RMCE secuencial - Integración en Lugar de emplazamiento Genómico

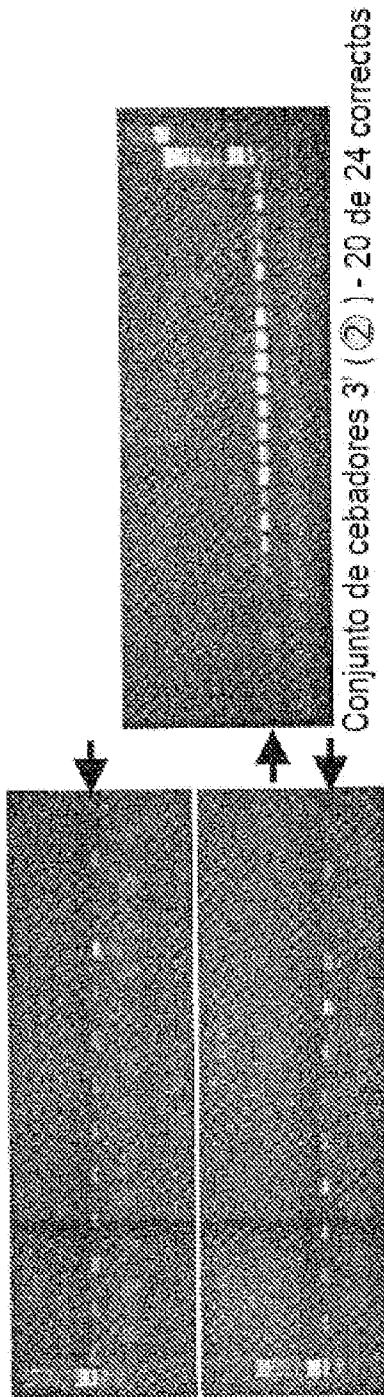


Selección:	Puro	Puro + 6TG	G418	G418 + 6TG
Núm. colonias:	239	220	360	198

Fig. 30

Confirmación de inserción satisfactoria en el Lugar de emplazamiento genómico

Colonias: Resistentes a 6-TG y Puro



Conjunto de cebadores 3' (①) - 23 de 24 correctos

Conjunto de cebadores 3' (②) - 20 de 24 correctos

Resumen:

	puro + 6TG	puro	6TG + 6TG	6TG
Colonia mutan.	220	239	103	360
%	3'	5'	5'	3'
PCR de análisis	23/24	20/24	19/24	22/24
		22/24	22/24	11/24

Fig. 31

Confirmación por PCR del curado del extremo 3'

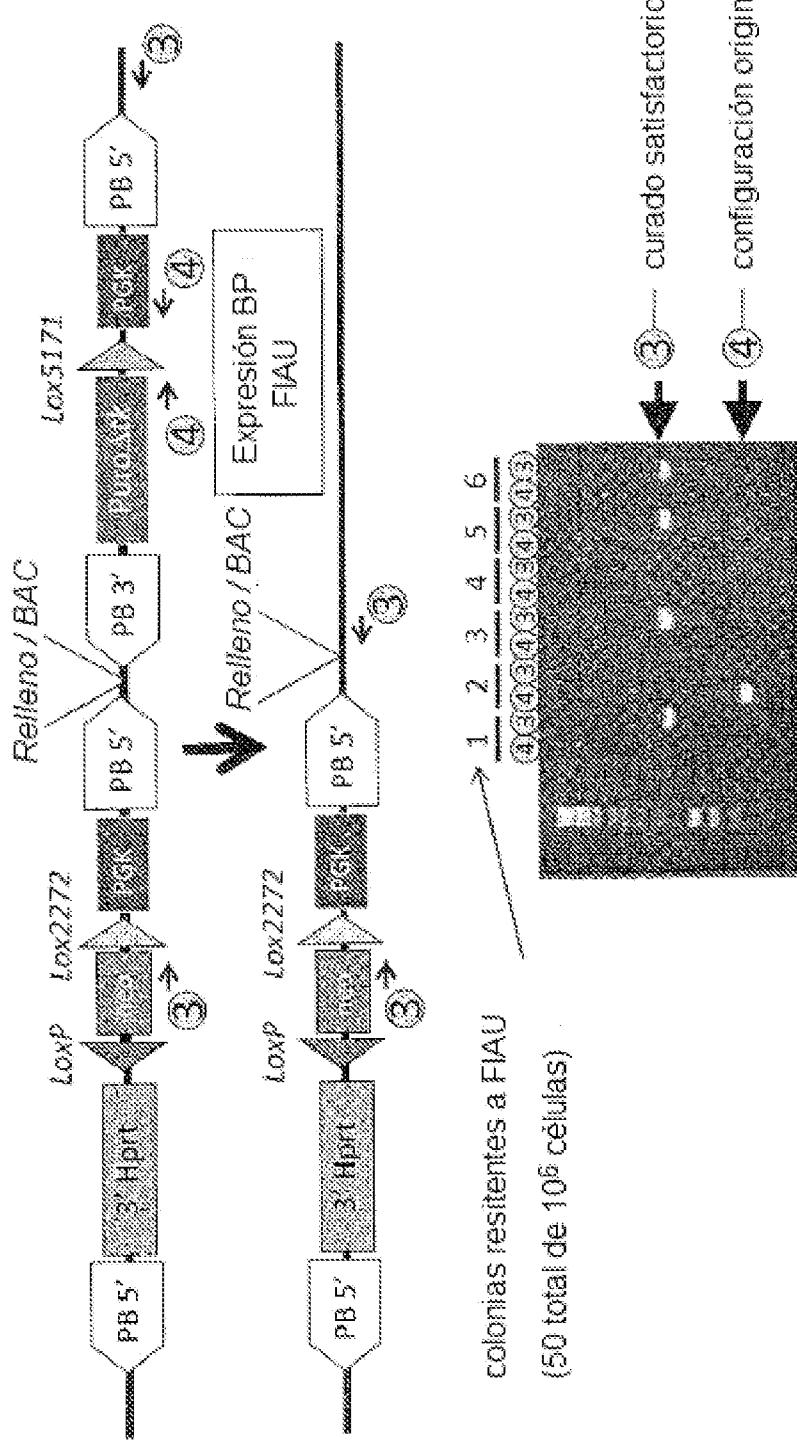


Fig. 32

Inserción de BAC núm. 1 - Diagnóstico por PCR

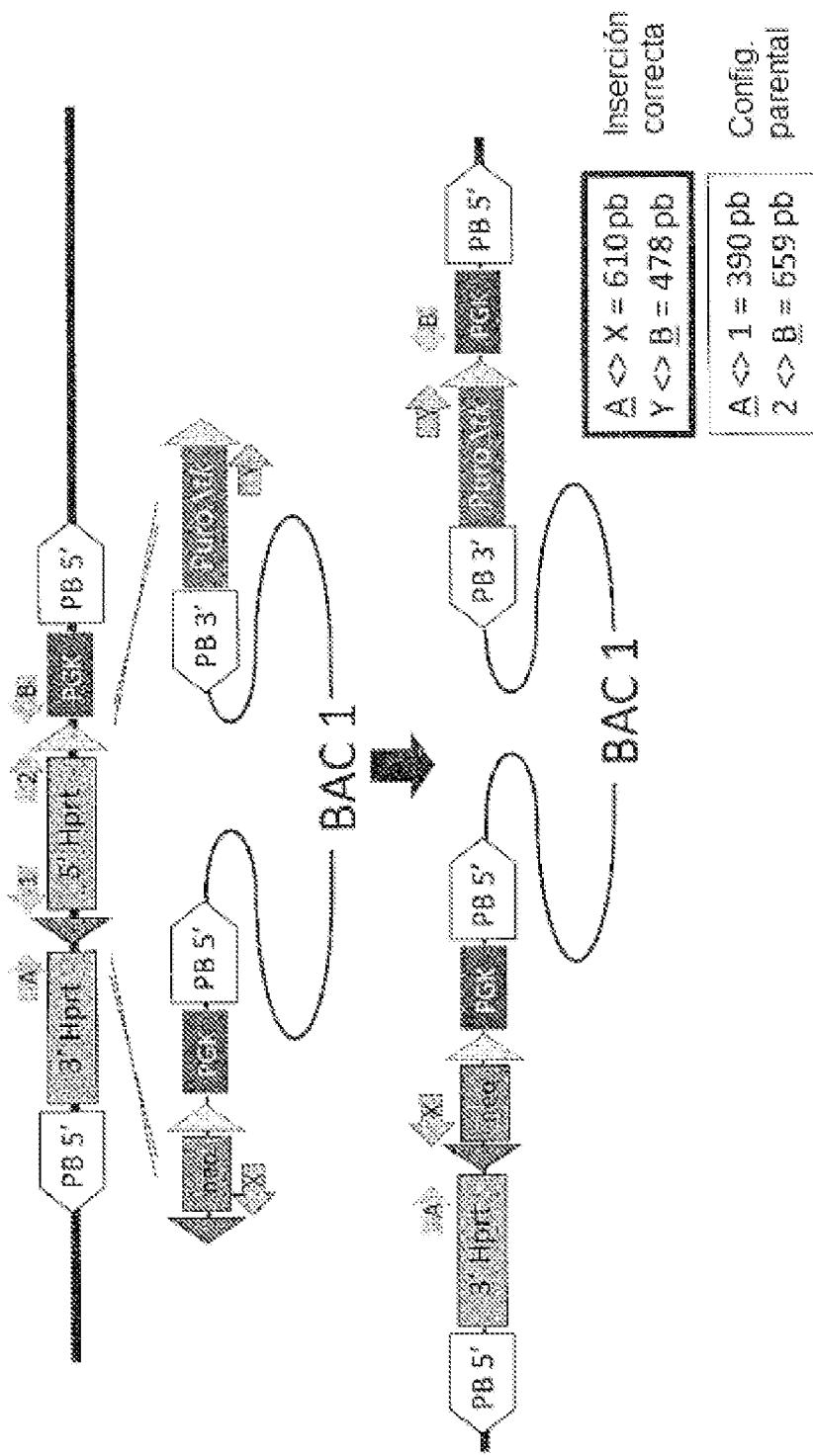
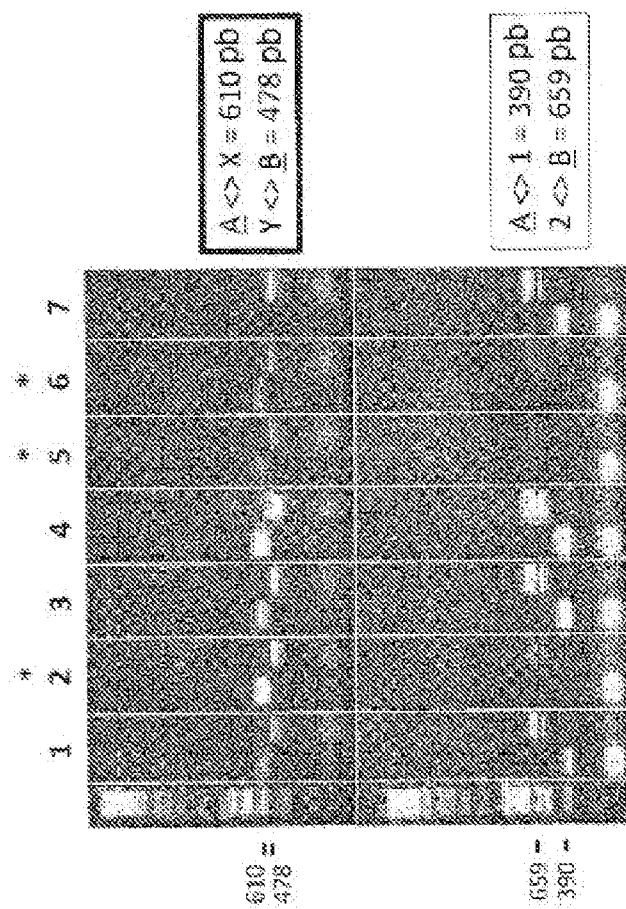


Fig. 33

Inserción de BAC núm. 1 - Diagnóstico por PCR



*Los clones núm. 2, 5 y 6 tienen BAC núm. 1 insertado
Los clones núm. 1, 3, 4 y 7 probablemente tienen BAC núm. 1
insertado, pero las muestras se mezclan con
las líneas celulares parentales.

Fig. 34