



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 321 036**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 5/18 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **95920423 .1**

96 Fecha de presentación : **18.05.1995**

97 Número de publicación de la solicitud: **0759985**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.03.1997**

54 Título: **Ratones artríticos transgénicos.**

30 Prioridad: **19.05.1994 US 246242**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2009

73 Titular/es: **Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale
101, rue de Tolbiac
75654 Paris Cédex, FR
Centre National de la Recherche Scientifique,
Université de Strasbourg y
E.R. Squibb & Sons L.L.C.**

72 Inventor/es: **Benoist, Christophe, O.;
Mathis, Diane, J. y
Kouskoff, V.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

DESCRIPCIÓN

Ratones artríticos transgénicos.

5 La presente invención se refiere a animales transgénicos no humanos que se han modificado genéticamente para desarrollar artritis y proporcionar de este modo modelos animales para enfermedades artríticas humanas, tales como la artritis reumatoide. Más particularmente, la invención se refiere a animales transgénicos en los que poblaciones del receptor de linfocitos T (TCR) de los animales transgénicos consisten sustancialmente en copias de un TCR que (a) comprende subunidades TCR α y TCR β codificadas por un transgén y (b) dirige los linfocitos T para que reaccionen con autoantígenos en los animales transgénicos. De forma lo más particular posible, la invención se refiere a animales transgénicos en los que un repertorio limitado de TCRs, que consiste sustancialmente en TCRs codificados por un transgén, actúa durante el desarrollo del animal transgénico para iniciar una cascada de eventos que culmina con el desarrollo de síntomas artríticos graves en el animal transgénico, en un forma reproducible y por tanto predecible.

15 Antecedentes de la invención

Los animales tienen un conjunto complejo de defensas moleculares y celulares que se conoce colectivamente como el sistema inmune, el cual reconoce y ataca a células extrañas o endógenas pero anormales, potencialmente perjudiciales (representadas respectivamente, por ejemplo, por agentes patógenos tales como bacterias o virus y células cancerígenas o células infectadas con agentes patógenos), pero que no ataca sino que sólo tolera las células endógenas normales. Cuando se estimula con biomoléculas ajenas o anormales, el sistema inmune experimenta una serie de actividades diseñadas para neutralizar y destruir los agentes patógenos o las células cancerígenas o infectadas con agentes patógenos, con las que están asociadas las biomoléculas ajenas o anormales. Estas actividades, conocidas colectivamente como una respuesta inmune, pueden consistir en una respuesta inmune mediada por células, una respuesta inmune humoral (mediada con anticuerpos) o una respuesta inmune que incluye elementos de respuestas mediadas por células y de respuestas humorales.

Las respuestas inmunes humorales están mediadas por anticuerpos, glicoproteínas que se unen a biomoléculas específicas ajenas o anormales y atraen hacia ellos otros componentes del sistema inmune. Los anticuerpos son moléculas de inmunoglobulinas (Ig) producidas por linfocitos B, linfocitos que se originan en la bolsa aviar o en la médula ósea de mamíferos, pero que emigran y maduran en otros órganos, particularmente el bazo. Robertson, M., *Nature* 301:114 (1983). Las respuestas inmunes mediadas por células son el resultado de actividades de los linfocitos T, linfocitos que sufren una maduración en el timo de un animal. Tizard, pág. 163.

Las actividades de los linfocitos T varían considerablemente entre diferentes subpoblaciones de linfocitos T dentro de un animal. Los linfocitos T citotóxicos reconocen y destruyen células ajenas (rechazo de trasplante) o células endógenas pero anormales (p. ej., células cancerígenas o células infectadas con parásitos intracelulares, tales como virus y bacterias). Los linfocitos T cooperadores interactúan con linfocitos B y linfocitos T citotóxicos y producen biomoléculas que influyen en el comportamiento de las células anteriores, para favorecer y dirigir la producción de anticuerpos y de actividades citotóxicas, respectivamente. Mosier, D. E., *Science* 158:1573-1575 (1967). También existen otras clases de linfocitos T, que incluyen los linfocitos T supresores y los linfocitos T de memoria. Miedema, F. y Melief, C.J.M., *Immunol. Today* 6:258-259 (1983); Tizard, I.R., *Immunology: An Introduction*, Saunders, Philadelphia (1988), págs. 225-228. Las clases de linfocitos T se diferencian hasta cierto punto, basándose en que diferentes linfocitos T muestran diferentes proteínas CD en sus superficies. Los linfocitos T inmaduros muestran las proteínas CD4 y CD8 (es decir, los linfocitos T inmaduros son CD4⁺8⁺), los linfocitos T cooperadores maduros son CD4⁺8⁻ (es decir, muestran la proteína CD4 pero no la proteína CD8) y los linfocitos T citotóxicos maduros son CD4⁻8⁺ (es decir, muestran la proteína CD8 pero no la proteína CD4). Smith, L., *Nature* 326:798-800 (1987); Weissman, I.L. y Cooper, M.D., *Sci. American* 269:65-71 (1993).

Para que funcionen de forma adecuada, los linfocitos T y B de un sistema inmune animal tienen que identificar de forma fidedigna y precisa una cantidad enorme de composiciones moleculares que “no son propias”, es decir, composiciones que son ajenas o endógenas, pero que se expresan de forma anormal. El reconocimiento y la identificación a través del sistema inmune tienen lugar a nivel molecular. Un antígeno, una composición molecular que tiene el potencial para generar una respuesta inmune, está compuesto por una o varias características para la identificación según el tamaño molecular, conocidas como epítopos. Un antígeno polipeptídico que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende, p. ej., cien aminoácidos, podría comprender docenas de epítopos, en donde cada epítipo está definido por una porción del polipéptido que comprende desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 15 aminoácidos. El número de epítopos que se puede obtener a partir de polipéptidos aislados, se estima que puede ser aproximadamente 10 millones. Tizard, pág. 25.

Un antígeno que está rodeado por un linfocito T o B de un animal, se tiene que identificar por estar asociado con antígenos endógenos normales (es decir, propios) y una respuesta inmune contra él mismo sería perjudicial para el animal, o por estar asociado con antígenos ajenos o anormales (es decir, no propios) y la respuesta inmune al mismo se tiene que preparar. El proceso se puede comparar con una identificación de un “amigo o enemigo” en el combate humano. Si el sistema inmune falla en la identificación de los antígenos asociados con los agentes patógenos invasores o con las células tumorales, como no propios, entonces estos “enemigos” se pueden deslizar a través de las defensas del sistema. Si el sistema inmune identifica erróneamente los antígenos endógenos de un animal como no propios, entonces las partes del cuerpo animal que comprenden los antígenos endógenos, tendrán que enfrentarse a un “fuego

amigo” del sistema inmune. La situación anterior, en la que un sistema inmune de un animal batalla erróneamente en una “guerra” celular y molecular contra otra parte normal del cuerpo del animal, se conoce generalmente como “enfermedad autoinmune”.

Como parte de los medios del sistema inmune para identificar antígenos, los linfocitos T y B individuales producen receptores de antígenos que se muestran en la superficie celular de los linfocitos T o B y que se unen a antígenos específicos. Los receptores de los linfocitos T (TCRs) producidos en un linfocito T aislado y mostrados sobre el mismo, comprenden subunidades polipeptídicas pesadas (TCR β) y ligeras (TCR α). Cada subunidad α y β del TCR tiene una región constante carboxi-terminal, cuya secuencia de aminoácidos no varía de un linfocito T a otro, y una región variable amino-terminal, cuya secuencia de aminoácidos varía de un linfocito T a otro. Cuando las subunidades TCR α y TCR β se asocian entre sí, las regiones variables de las subunidades polipeptídicas de TCR α y TCR β , se combinan para formar la única porción que se une al antígeno del TCR. Davis, M.M. y Bjorkman, P. J., *Nature* 334:395-404 (1988). De forma similar, los linfocitos B individuales producen y muestran receptores antigénicos que comprenden moléculas de Ig que tienen porciones únicas que se unen a antígenos debido a las secuencias de aminoácidos únicas en las regiones variables de cada una de las dos subunidades del anticuerpo, conocidas como las cadenas pesadas de la Ig y las cadenas ligeras de la Ig. Cada membrana de los linfocitos B comprende de 20.000 a 200.000 moléculas de Ig idénticas. Tizard, págs. 78-80 y 202.

Aunque cada linfocito T o B individual muestra receptores de antígenos idénticos, un grupo animal de receptores de antígenos diferentes es bastante diverso. La región variable de una cadena pesada de Ig o la de una cadena de TCR β , está codificada por tres segmentos génicos, el segmento variable (V), el segmento de diversidad (D) y el segmento de unión (J). La región variable de una cadena ligera de Ig, o la de una cadena de TCR α , está codificada por los segmentos génicos V y J. Las secuencias de ADN múltiples que codifican muchos segmentos génicos diferentes V, D y J, están presentes como copias no expresadas en el ADN de la línea germinal; un grupo análogo pero diferente de segmentos génicos variables para las subunidades de TCR también está presente. Durante el desarrollo de un animal, los genes que codifican diversas regiones variables, se generan en células individuales del sistema inmune mediante la unión al azar de los segmentos génicos V, D y J, o V y J. El proceso de reorganización del ADN que genera una región variable ensamblada al azar de una cadena pesada de Ig o de una subunidad TCR β , se denomina unión V-D-J; el proceso análogo que genera una región variable reorganizada, de una cadena ligera de Ig o de una subunidad TCR α , se denomina unión V-J. Sakano, H. y col., *Nature* 280:288-294 (1979); Early, P. y col., *Cell* 19:981-992 (1980); Alt, F.W. y col., *Science* 238:1079-1087 (1987); Harlow, E. y Lane, D., “*Antibodies: A Laboratory Manual*”, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), páginas 10-18; Davis, M.M. y Bjorkman, P.J., *Nature* 334:395-404 (1988). Adicionalmente, se introducen mutaciones puntuales en la región variable mediante un procedimiento denominado mutación somática. Bernard, O. y col., *Cell* 15:1133-1144 (1978).

Una Ig o un gen de la subunidad TCR reorganizado funcionalmente es uno en el que las reorganizaciones del ADN de las uniones V-D-J o V-J y/o una mutación somática, no se han producido en un marco de lectura que está terminado prematuramente durante la biosíntesis debido a la introducción de codones de detención o mutaciones por cambio del marco de lectura. Debido a que cada uno de los linfocitos T o B del sistema inmune expresa genes que codifican sus receptores de antígeno respectivos, en los que está presente una única región variable reorganizada funcionalmente, se generan muchos linfocitos T o B diferentes, produciendo cada uno un receptor que tiene una región de reconocimiento del antígeno única. El catálogo total de los diferentes receptores de antígenos mostrados sobre los linfocitos T de un animal, se denomina el repertorio de TCRs del animal. Bevan, J.J., *Science* 264:796-797 (1994).

En los linfocitos T o B maduros, la unión del antígeno al receptor del antígeno en una célula, activa la célula, es decir, estimula a la célula para emprender actividades relacionadas con la generación de una respuesta inmune mediada con células o humoral. Por el contrario, en linfocitos T o B inmaduros, la unión del antígeno a un receptor de antígenos mostrado en TCR o de un linfocito B, respectivamente, produce la eliminación de la célula mediante un proceso denominado selección negativa o delección clonal. La delección clonal tiene lugar durante el desarrollo normal de un animal sano de tipo silvestre y es un mecanismo mediante el cual el sistema inmune aprende a tolerar los antígenos endógenos (propios) normales del animal, es decir, a tratar los autoantígenos del animal como antígenos no inmunógenos. Un fallo del sistema inmune para conseguir o mantener la tolerancia de los autoantígenos, puede dar como resultado respuestas autoinmunes (es decir, una respuesta autoinmune frente a autoantígenos), lo que puede culminar en una enfermedad autoinmune en animales que incluyen al ser humano. La enfermedad autoinmune puede tener lugar cuando una respuesta inmune adecuada frente a un antígeno que no sea propio, da como resultado la producción de biomoléculas inmunofectoras (p. ej., autoanticuerpos) o células que tienen una reacción cruzada con autoantígenos. Las enfermedades autoinmunes humanas incluyen estados incapacitantes, tales como la esclerosis múltiple (MS) y el lupus eritematoso sistémico (SLE). Para una revisión, véase Steinmann, L., *Sci. American* 269:107-114 (1993).

Aunque los linfocitos B se pueden unir directamente al antígeno soluble, los linfocitos T responden al antígeno sólo cuando se presenta sobre las clases específicas de otras células, conocidas genéricamente como células presentadoras de antígeno (APCs). Las APCs, p. ej., los macrófagos y las células dendríticas presentan antígenos obtenidos a partir de polipéptidos, a través de glicoproteínas, conocidas como proteínas del CPH (complejo principal de histocompatibilidad), que se presentan sobre la superficie de las APCs. Bevan M. J. y col., *Science* 264:796-797 (1994). Las proteínas del CPH se unen a los antígenos genéricamente; los determinantes de la especificidad en un complejo TCR:Ag:CPH son (1) las secuencias polipeptídicas únicas de la porción variable del TCR y (2) las secuencias polipeptídicas únicas del antígeno. Sin embargo, los antígenos oligopéptidos presentados en el CPH, están alojados en cierta medida dentro

de una molécula de CPH y el reconocimiento del TCR del antígeno tiene lugar sólo en el contexto de una clase adecuada de molécula del CPH. Janeway, C.A., *Sci. American* 269:73-79 (1993). Este fenómeno, denominado restricción del CPH, tiene una importancia fundamental para el reconocimiento y la fisiología de los antígenos de linfocitos T. Zinkernagel, R.M. y Doherty, P.C., *Nature* 248:701-702 (1974).

Los genes que codifican las proteínas del CPH son diversos; sin embargo, a diferencia de Ig y de las moléculas del TCR, que varían de célula en un animal individual, los antígenos del CPH varían de un animal individual a un animal individual o de un grupo de animales individuales relacionados a otro grupo. Los miembros de grupos familiares, representados en el ratón por cepas endogámicas de ratones, comparten antígenos similares del CPH entre sí, pero no con individuos de otras cepas de ratones. Snell, G.D. *Science* 213:172-178 (1981). Debido a que moléculas distintas del CPH serán capaces de unirse a antígenos diferentes, los antígenos que pueden ser reconocidos por los linfocitos T (es decir, que se unen en el contexto del CPH) y a los que pueden responder, varían entre diferentes cepas de ratones. En los seres humanos, distintas moléculas particulares del CPH están más asociadas con enfermedades autoinmunes, debido supuestamente a que estas moléculas distintas del CPH son más competentes para unirse a autoantígenos (y presentarse de este modo a los linfocitos T). Vaughan, en *"Immunological Diseases"*, 3ª ed. vol. II, Samter, M., compilador, págs. 1029-1037 (1978); Steinman, L., *Sci. American* 269:107-114 (1993).

La artritis es una manifestación dolorosa de muchas enfermedades autoinmunes humanas. La etiología de la artritis es desconocida, en la mayoría de los casos. Las lesiones inflamatorias de las articulaciones sinoviales tienen lugar en enfermedades autoinmunes generales, tales como SLE, pero están presentes más frecuentemente en enfermedades autoinmunes específicas, tales como artritis reumatoide (RA) o artritis reactiva (ReA). La RA, la enfermedad reumática prototipo, aparece por lo demás en un contexto inmunológico globalmente normal. La RA es una enfermedad inflamatoria crónica que se caracteriza por el desarrollo de una o varias membranas sinoviales dentro de un tejido muy vascularizado, conocido como el panus. El panus consiste en diversos tipos de células distintas, que incluyen fibroblastos sinoviales residentes, así como células mononucleares infiltrantes que pueden producir biomoléculas efectoras y mediadoras de la inflamación. El panus muestra un crecimiento invasivo en los tejidos circundantes, con una destrucción progresiva correspondiente del cartílago de la articulación y del hueso. Harris, E.D., Jr., en *"Textbook of Rheumatology"*, Kelly, W. y col., compiladores, W.B. Saunders Co., Philadelphia, páginas 905-942 (1989).

Los síntomas de la artritis reumatoide varían desde la inflamación de una o varias articulaciones y el dolor asociado, hasta una rigidez matutina, comparativamente suave que afecta a una o a varias articulaciones de las extremidades. En los casos graves, la inflamación crónica produce la destrucción y la deformidad del cartílago y del hueso en las articulaciones, acompañada de un dolor crónico y de una deformación física de las extremidades afectadas. El dolor crónico y la deformación tienen evidentemente serias consecuencias en relación con la pérdida de movilidad en la articulación y la calidad de vida del individuo afectado. Generalmente, el 50% de los pacientes con RA pueden llevar una vida bastante normal; aproximadamente el 25% están parcialmente incapacitados con una invalidez gradualmente progresiva; y aproximadamente el 25% lleva una vida muy restringida. Una pequeña proporción (menos del 10%) de los pacientes con RA están totalmente incapacitados. Christian, C.L. y Paget, S.A., *"Rheumatoid Arthritis"* en *Immunological Diseases*, vol. II, 3ª ed., Samter, M., compilador, Little, Brown and Co., páginas 1061-1076 (1978).

La RA es una enfermedad humana frecuente que afecta a cerca del 1% de la población humana en los países desarrollados, y que tiene un componente complejo de predisposición genética. Wordsworth, P., *"Current Opinion in Immunology"* 4:766-769 (1992). La RA también se observa en animales domésticos, especialmente en perros. Tizard, págs. 527-528. Algunos estudios indican que en los humanos, la RA es de dos a tres veces más común en las hembras que en los machos. Christian, C.L. y Paget, S.A., *"Rheumatoid Arthritis"* en *Immunological Diseases*, vol. II, 3ª ed., Samter, M., compilador, Little, Brown and Co., páginas 1061-1076 (1978). Se ha sugerido que la hormona femenina estrógeno estimula las secuencias de ADN que inducen indirectamente la producción de interferón γ , el cual estimula la aparición de moléculas del CPH humano en los revestimientos de la articulación sinovial, en donde normalmente no se encuentran. Fox, H.S. y col., *J. Immunol.* 146:4362-4367 (1991).

La causa de la artritis reumatoide es desconocida en la actualidad y, en ausencia de una evidencia clara, es objeto de debate. La enfermedad se desarrolla del modo siguiente. Histológicamente, las articulaciones afectadas están infiltradas con células de la estirpe hemopoyética (linfocitos, macrófagos y/o neutrófilos) que producen citocinas inflamatorias. El revestimiento sinovial mismo es hiperplásico y forma un "panus" similar a granuloma junto con células inflamatorias, el cual erosiona e invade el cartílago y el hueso. Enzimas obtenidas a partir de procesos exudativos y proliferativos de la inflamación, hidrolizan diversos sustratos en el cartílago, el hueso, los ligamentos y los tendones, dando como resultado una deformación estructural de las articulaciones sinoviales. Mientras que la RA progresa, los neutrófilos infiltrantes se pueden suplementar o sustituir parcialmente con linfocitos CD4⁺, los cuales pueden formar nódulos linfoides y centros germinales. Los factores reumatoides, los autoanticuerpos del tipo IgM dirigidos hacia anticuerpos del tipo IgG, están presentes en el suero de algunos pacientes, pero no de todos. Christian, C.L. y Paget, S.A., *"Rheumatoid Arthritis"* en *Immunological Diseases*, vol. II, 3ª ed., Samter, M., compilador, Little, Brown and Co., páginas 1061-1076 (1978).

Aunque los eventos terminales de la patogénesis de la RA están relativamente bien estudiados o al menos descritos, las causas celulares y moleculares del inicio de la RA y los eventos tempranos de la RA, todavía no se han descrito con detalle. Por ejemplo, las respuestas inmunes citotóxica y humoral, se han descrito en modelos de RA ya conocidos previamente. Chiochia, G. y col., *J. Immunol.* 145:519-525 (1990). De hecho, ha sido objeto de discusión si la RA representa una respuesta inmune frente a autoantígenos con consecuencias secundarias inflamatorias o bien una mala

regulación de la función de los macrófagos. Firestein, G.S. y Zwaifler, N.J., *Arthritis and Rheumatism* 33:768-773 (1990); Lanchbury, J.S. y Pitzalis, C., *Current Opinion in Immunology* 5:918-924 (1993). Aunque se han propuesto algunos candidatos de autoantígenos para la RA, ninguno se ha identificado de forma concluyente. Sano, H. y col., *J. Cell Biol.* 110:1417-1426 (1990).

5

Los modelos animales de RA actuales incluyen los siguientes modelos inmunológicos. Para una revisión, véase Schwartz, R.S., en *Fundamental Immunology*, 3ª ed., Paul, W.E., compilador, Raven Press, N.Y., páginas 1064-1067 (1993).

10 1. La artritis inducida con colágeno (CIA) parece depender principalmente de los autoanticuerpos. Se induce con la inmunización de ratas o ratones con colágeno de tipo II (el tipo dominante en el cartílago de la articulación), o mediante administración de anticuerpos para el colágeno de tipo II. Los linfocitos T cooperadores específicos del colágeno también pueden transmitir la enfermedad. Los anticuerpos IgG se concentran en los fluidos sinoviales y forman depósitos en la articulación, conduciendo presumiblemente a la inflamación. Existe un modelo similar en
15 conejos, pero está peor caracterizado. Jasin, H.E., *Fed. Proc. (USA)* 32:147-152 (1973).

2. La artritis con adyuvante se induce en cepas de ratas susceptibles, mediante inyección de *Mycobacterium tuberculosis* en aceite. A continuación sigue la inflamación y la hinchazón de las articulaciones, predominantemente en las partes distales de las extremidades, que son transitorias y desaparecen a los 21 días, dejando secuelas de la destrucción. Pearson, C.M., *J. Chronic Dis.* 16:863-874 (1963). En este caso, la enfermedad es transferible desde las ratas con la enfermedad a animales vírgenes, con poblaciones o líneas de linfocitos T. Parece ser que los linfocitos T y/o los anticuerpos producidos por la inmunización con *M. tuberculosis*, pueden tener una reacción cruzada entre estructuras de proteoglicanos en las bacterias y el cartílago. La artritis inducida con pristano (PIA), se induce de forma similar mediante inyección del fármaco pristano en aceite mineral. Potter, M. y Wax, J.S., *J. Immunol.* 127:1591-1595
25 (1981).

3. La artritis *lpr/fas* tiene lugar en ratones de la cepa MRL/lpr, la cual es portadora de una mutación en el gen *fas*, implicado en la inducción de la muerte celular mediante apoptosis. A causa de esta deficiencia, tiene lugar una linfoproliferación masiva en estos ratones, compuesta principalmente por una población inusual de linfocitos T. Como resultado, aparecen diversas manifestaciones autoinmunes que incluyen la inflamación progresiva de las articulaciones. Cheng, J. y col., *Science* 263:1759-1762 (1994).
30

Ninguno de estos modelos es totalmente satisfactorio. En la CIA, la artritis con adyuvante y la PIA, el animal se inmuniza artificialmente con antígenos que producen una respuesta inmune que tiene una reacción cruzada con las biomoléculas del soporte del cartílago; por ejemplo, las tres formas de artritis pueden ser tratadas mediante la enseñando al sistema inmune la tolerancia hacia el colágeno de tipo II. Thompson, H.S.G. y Staines, N.A., *Clin. Exp. Immunol.* 64: 581-586 (1985), Zhang, Z.J. y col., *J. Immunol.* 145: 2489-2493 (1990); Thompson, S.J. y col. *Immunol.* 79:152-157 (1993). Sin embargo, la destrucción de las estructuras asociadas al cartílago en la RA, se produce tarde, posiblemente como un efecto secundario, por lo que estos modelos probablemente no reflejan la artritis en la que los acontecimientos primarios o tempranos en el sistema inmune, dan como resultado una cascada de acontecimientos autoinmunológicos que culmina en la artritis. La artritis *lpr/fas* artritis es una enfermedad linfoproliferativa con consecuencias artríticas sólo secundarias, una característica que es claramente diferente del contexto inmunológico mundialmente normal de la RA. Un modelo animal que incorpora el método de la CIA en un antecedente soporte de la enfermedad autoinmune, produce síntomas más graves de la artritis, pero adolece de ambos inconvenientes anteriores.
40
45 Watson, W.C. y col., *J. Exp. Med.* 172:1331-1339 (1990).

Además, ninguno de los métodos inmunológicos anteriores, proporciona un modelo animal en el que el animal desarrolla síntomas graves de la artritis, de forma reproducible y, por tanto, de forma previsible, lo que permite la caracterización y la manipulación de los eventos inmunológicos tempranos en la RA. Recientemente, la capacidad de producir animales transgénicos, ha proporcionado una oportunidad para desarrollar modelos animales que reflejen más fielmente las enfermedades humanas, incluyendo las enfermedades autoinmunes. Watson, J.D. y col., "La introducción de genes extraños en ratones", en *Recombinant DNA*, 2ª ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York (1992), págs. 255-272; Lee, M.-S. y Sarvetnick, N., *Curr. Op. Immunol.* 4: 723-727 (1992). Un animal transgénico es un animal en el que se ha sido introducido por medios no naturales (es decir, mediante la manipulación humana), uno o más genes
50 que no aparecen naturalmente en el animal, por ejemplo, genes ajenos, genes endógenos modificados genéticamente, etc. Los genes introducidos de forma artificial, conocidos como transgenes, pueden comprender secuencias de ADN extraño, es decir, secuencias que no se encuentran normalmente en el genoma del animal hospedador. Alternativa o adicionalmente, los transgenes pueden comprender secuencias de ADN endógeno que son anormales en la medida en que se han reorganizado o se han mutado *in vitro*, con el fin de alterar el patrón normal *in vivo* de la expresión del gen, o para modificar o eliminar la actividad biológica de un producto génico endógeno, codificado por el gen. Watson, J.D. y col., "La introducción de genes extraños en ratones", en *Recombinant DNA*, 2ª ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York (1992), págs. 255-272; Gordon, J.W., *Intl. Rev. Cytol.* 115:171-229 (1989); Jaenisch, R., *Science* 240:1468-1474 (1989); Rossant, J., *Neuron* 2:323-334 (1990).
55

60 A lo largo de la investigación del sistema inmune, los científicos han generado diversos animales TCR transgénicos, es decir, animales que comprenden un transgén que dirige la expresión de un TCR particular o de una subunidad del TCR. Krimpenfort, P. y col., *EMBO Journal* 7:45-50 (1988), Teh, H.S. y col., *Nature* 335:229-233 (1988); Bluthmann, H. y col., *Nature* 334:156-159 (1988); Uematsu, Y. y col., *Cell* 52:831-841 (1988); Steinmetz, M. y col., *Genome*

31:652-655 (1989), Berg, L.J. y col., *Cell* 58:1035-1046 (1989); Uematsu, Y., *Eur. J. Immunol.* 22 603-606 (1992); Borgulya, P. y col., *Cell* 69:529-537 (1992); Katz, J.D. y col., *Cell* 74:1089-1100 (1993). La introducción de un alelo transgénico del TCR "knock-out" (con pérdida de función) en los ratones, da como resultado animales con una reducción sustancial de los linfocitos T. Krimpenfort, P.J.A. y Berns, A.J.M., documento de patente de EE.UU. n° 5.175.384 (29 de diciembre, 1992). Unos efectos biológicos más sutiles son el resultado de la introducción de alelos transgénicos de TCR que confieren especificidades alteradas a los linfocitos T de un animal. Sin embargo, la introducción de un alelo transgénico del TCR obtenido a partir de un clon de linfocito T, capaz de transferir la artritis inducida por colágeno en ratones, no produce artritis en los animales transgénicos resultantes. Mori, L. y col., *J. Exp. Med* 176:381-388 (1992).

Las referencias expuestas anteriormente y en otros lugares en esta memoria, se ofrecen exclusivamente para la divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud y nada en este documento se interpretará como una admisión de que los inventores no tienen derecho a predatar dichas divulgaciones en virtud de una invención anterior.

Dado el estado de la técnica, existe una necesidad de modelos animales, en los que el animal desarrolle síntomas graves de artritis de forma reproducible y, por tanto, de manera previsible, con el fin de caracterizar y controlar los acontecimientos inmunológicos tempranos en la artritis autoinmune, especialmente en la artritis reumatoide. En consecuencia, es un objeto de esta memoria proporcionar animales transgénicos no humanos, que hayan sido modificados genéticamente para desarrollar artritis autoinmunitaria, en virtud del hecho de que las poblaciones de receptores de linfocito T (TCR) de los animales transgénicos, consisten sustancialmente en copias de un TCR que (a) comprende las subunidades TCR α y TCR β codificadas por un transgén y (b) dirige los linfocitos T para que reaccionen con autoantígenos durante el desarrollo de los animales transgénicos para iniciar una cascada de eventos autoinmunitarios que culmina con animales transgénicos que desarrollan síntomas graves artríticos en una manera reproducible y, por tanto, previsible.

También es un objeto de esta memoria, proporcionar materiales y métodos para preparar animales transgénicos no humanos y artríticos, en donde algunos de los cuales se puedan emplear para generar composiciones terapéuticas anti-artríticas.

Otro objeto de esta memoria es proporcionar métodos de utilización de los animales transgénicos no humanos y artríticos, para evaluar el potencial anti-artrítico o artritogénico de las diversas composiciones en cuestión, que incluyen genes humanos y animales y los productos de los genes codificados de este modo.

Además, es un objeto de esta memoria proporcionar hibridomas obtenidos a partir de linfocitos B o T de los animales artríticos transgénicos no humanos y biomoléculas específicas producidas en relación con la artritis asociada al transgén, por los hibridomas y los linfocitos B y T, a partir de los cuales se han obtenido.

Aún más, es un objeto de esta memoria proporcionar una proteína aislada endógena a los animales, incluidos los seres humanos que comprende autoantígenos artritogénicos polipeptídicos, unos métodos de purificación o de producción de la proteína aislada, y unos métodos para emplear la proteína o las composiciones aisladas, obtenidas a partir de los mismos para el tratamiento de enfermedades artríticas humanas y animales.

Peccoud J. y col., *EMBO Journal*, vol. 9, n° 13, páginas 4215-4223 (1990), describen el diseño de residuos de contacto del antígeno sobre una molécula de la clase II del CPH.

El documento de patente WO 92/07070 describe ratas transgénicas y modelos animales de enfermedad inflamatoria.

La presente invención proporciona un ratón transgénico artrítico cuyas células de la línea somática y germinal contienen un transgén que codifica un receptor de linfocitos T (TCR), en el que dicho TCR tiene una subunidad alfa que comprende una región variable que tiene una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO: 5 y una subunidad beta que comprende una región variable que tiene una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en la SEQ ID NO: 7, en donde la expresión de dicho transgén produce en dicho ratón una inflamación crónica y una deformación de una o de varias articulaciones sinoviales y en donde dicho transgén no es endógeno.

La presente invención también proporciona un método para producir un ratón transgénico que tiene un fenotipo de inflamación crónica y de deformación de una o de varias de las articulaciones sinoviales, que comprende introducir en un ratón un vector vírico que comprende una primera secuencia de ADN, seleccionada a partir de SEQ ID NO. 2 y SEQ ID NO. 4 y una segunda secuencia de ADN, seleccionada a partir de SEQ ID NO. 3 y SEQ ID NO. 6

La presente invención proporciona adicionalmente un método *in vitro* para determinar si un animal aislado, que incluye un ser humano, posee un riesgo mayor de desarrollar artritis reumatoide, que comprende someter a ensayo linfocitos T aislados a partir de dicho animal para estudiar la reactividad de los linfocitos T frente a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.1.

Sumario de la invención

La invención se basa en el descubrimiento inesperado de que ratones transgénicos no humanos, con un repertorio limitado de TCRs que consiste sustancialmente en los TCRs codificados por transgenes, tiene un fenotipo que comprende selectivamente los síntomas graves clásicos de la artritis reumatoide. El repertorio de TCRs de los ratones artríticos, aunque limitado, es funcionalmente viable. El repertorio limitado de TCRs de los ratones artríticos, consiste en una parte sustancial de una clase de TCRs que reconoce un epítipo de un antígeno endógeno polipeptídico y artrítogénico. En una realización preferida, la invención se refiere a ratones transgénicos artríticos, tal y como se definen en las reivindicaciones, en los que un fenotipo artrítico está presente debido a la inserción en los genomas de los ratones, de transgenes que codifican las subunidades α y β del TCR que se combinan en los linfocitos T de un animal transgénico, para formar un TCR que reconoce un antígeno que comprende uno o varios epítopos de un oligopéptido correspondiente a los aminoácidos 41-61 de la ribonucleasa pancreática bovina (BPR), y que tiene la secuencia de aminoácidos

Lys-Pro-Val-Asn-Thr-Phe-Val-His-Glu-Ser-Leu-Ala-Asp-Val-Gln-Ala-Val-Cys-Ser-Gln-Lys [SEQ ID NO. 1]

y/o uno o varios epítopos de un autoantígeno polipeptídico endógeno artrítogénico, que pueden tener sustancialmente una reacción cruzada con los del oligopéptido obtenido a partir de BPR.

En un aspecto, la invención proporciona un modelo de ratón, tal y como se define en las reivindicaciones, para la artritis. Debido a la naturaleza que produce incapacidad y que es dolorosa de la artritis en los individuos afectados, así como a sus consecuencias económicas para la sociedad, se desea obtener el beneficio de un modelo animal de la artritis que sea fiable y reproducible. El modelo de ratón transgénico de la invención proporciona un modelo en el que los animales desarrollan síntomas graves de la artritis en una manera fiable y reproducible. La fiabilidad y la capacidad de reproducir el modelo de ratón transgénico de la invención, no se observan en los modelos animales de la artritis, previamente conocidos.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona (1) métodos, tal y como se definen en las reivindicaciones, para la producción de un ratón transgénico que tiene un repertorio limitado de TCRs, debido a la expresión en el mismo de transgenes que codifican subunidades α y β de TCR, y la solicitud describe (2) unos medios para generar los animales transgénicos de la invención, que incluyen moléculas aisladas de ADN capaces de expresar secuencias de ADN que codifican la región variable y constante de las subunidades α y β en los linfocitos T de un animal transgénico, a fin de dirigir la formación de un TCR que reconoce un antígeno que comprende uno o varios epítopos de un oligopéptido que se corresponde con los aminoácidos 41-61 de la ribonucleasa pancreática bovina, y que tiene la secuencia de aminoácidos

Lys-Pro-Val-Asn-Thr-Phe-Val-His-Glu-Ser-Leu-Ala-Asp-Val-Gln-Ala-Val-Cys-Ser-Gln-Lys [SEQ ID NO. 1]

y/o uno o varios epítopos de un autoantígeno artrítogénico polipeptídico endógeno. Los oligopéptidos obtenidos a partir de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables del TCR de la invención, se pueden utilizar para diseñar composiciones terapéuticas.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para utilizar el modelo de ratón de la invención, para (1) someter a ensayo composiciones para estudiar su potencial anti-artrítico (terapéutico), y (2) para evaluar composiciones según su potencial artrítogénico (peligroso), tal y como se define en las reivindicaciones.

El ratón transgénico de la presente invención también es útil como fuente de células y de biomoléculas del sistema inmune que reconocen autoantígenos artrítogénicos polipeptídicos endógenos (PASAs). Los hibridomas obtenidos a partir de los linfocitos de los ratones transgénicos artríticos de la invención, producen biomoléculas efectoras inmunológicas que reconocen específicamente proteínas endógenas que comprenden PASAs. Estas células y biomoléculas del sistema inmune se utilizan para someter a ensayo la concentración y la distribución de las proteínas que comprenden PASAs en animales, incluidos los seres humanos, tal y como se define en las reivindicaciones.

Utilizando uno o varios de los ratones de la presente invención, o las biomoléculas efectoras inmunológicas producidas por los mismos, la presente solicitud describe además, métodos para identificar y purificar proteínas endógenas que comprenden PASAs procedentes de animales, incluidos los seres humanos. Así pues, la solicitud describe proteínas endógenas aisladas que comprenden PASAs, y la solicitud describe oligopéptidos obtenidos a partir de las proteínas endógenas aisladas que comprenden PASAs. También se proporcionan medios y métodos para producir las proteínas endógenas aisladas que comprenden PASAs, a partir de fluidos biológicos procedentes de animales, incluidos los seres humanos, así como mediante la expresión a través de tecnología de ADN recombinante.

La solicitud describe composiciones terapéuticas para la artritis reumatoide que comprenden proteínas endógenas aisladas que comprenden PASAs, uno o varios oligopéptidos aislados que comprenden secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de la secuencia polipeptídica de las proteínas endógenas que comprenden PASAs, o uno o varios polipéptidos sintéticos obtenidos a partir de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las subunidades de TCR, expresados por el hibridoma R28.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 describe los plásmidos utilizados para construir ratones transgénicos KRN. El panel A de la Figura 1, representa el paKRN, que está compuesto por secuencias de ADN procedentes de un vector procariótico, de pEMBL18 (línea gruesa) y por aproximadamente 16 kb de secuencias de ADN del alelo de TCR α reorganizado funcionalmente, procedente del hibridoma R28. Los exones (secuencias codificantes) de la subunidad TCR α están punteadas, y la dirección de su transcripción se indica con las flechas; las secuencias no codificadoras (intrones y secuencias que flanquean los exones) se muestran con líneas finas. La secuencia de ADN del exón que codifica la región variable de la subunidad TCR α , se proporciona insertada a la derecha; téngase en cuenta que un intrón corto que interrumpe la secuencia codificadora de la región variable pero que se escinde en el ARNm maduro, no se muestra en el diagrama del plásmido para una mayor claridad. El Panel B de la Figura 1 representa el pbKRN, que está compuesto por secuencias de ADN procedentes de un vector procariótico, pTZ18 (línea gruesa) y por aproximadamente 18 kb de secuencias de ADN procedentes del alelo de TCR β reorganizado funcionalmente, procedente del hibridoma R28. Los otros símbolos son como los del Panel A de la Figura 1, salvo que los exones que codifican la subunidad TCR β están rayados.

La Figura 2 representa un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos (“Southern”) para estudiar la presencia de secuencias de ADN del alelo transgénico KRN entre los descendientes producidos a partir de un cruce del animal transgénico KRN con un animal no transgénico. Una hembra transgénica KRN (círculo relleno) se cruzó con un macho no transgénico (cuadrado vacío), y las muestras de ADN aisladas a partir de las colas de la progenie resultante, se sometieron a ensayo con sondas de secuencias de ADN específicas del transgén, marcadas de forma detectable.

La Figura 3 compara los resultados de los análisis citofluorimétricos de la expresión de los receptores de linfocitos T en un ratón de tipo silvestre (izquierda), con los resultados obtenidos del examen de un ratón transgénico KRN (derecha). En el Panel A de la Figura 3, las células del nódulo linfático de los ratones se tiñeron con los anticuerpos policlonales dirigidos contra un epítipo compuesto de porciones alineadas de las subunidades TCR α y TCR β del hibridoma R28. En el Panel B de la Figura 3, las células se tiñeron con un anticuerpo monoclonal específico de la porción V β 6 de la región variable, utilizada en el gen para la subunidad TCR β del hibridoma R28 y otros genes de TCR β reorganizados funcionalmente.

La Figura 4 muestra las manifestaciones clínicas de la artritis en ratones artríticos transgénicos y el curso del desarrollo de la artritis en los mismos. En el Panel A de la Figura 4, la extremidad trasera de un ratón artrítico transgénico KRN x NOD se muestra adyacente a la extremidad trasera de un hermano de la camada no transgénico. El Panel B de la Figura 4 es un diagrama que muestra los resultados de mediciones cronológicas del grosor del tobillo de los ratones artríticos transgénicos KRN x NOD y de sus hermanos de camada no transgénicos.

La Figura 5 muestra el fenotipo artrítico inducido por el alelo transgénico KRN en diferentes fondos genéticos. Se muestran tres cruces; en cada caso un animal transgénico macho KRN (cuadrados rellenos) obtenido a partir de la cepa B6 de los ratones, se cruzó con un animal hembra no transgénico (círculos blancos) procedente de los diferentes fondos de la cepa. En el cruce esquematizado en el panel de la parte superior de la Figura 5, el animal hembra no transgénico procede de la cepa B6 de los ratones, y no se observa artritis en los descendientes. En el cruce mostrado en el panel de la parte del medio de la Figura 5, el animal hembra no transgénico procede de la cepa NOD de ratones, y tiene lugar una penetrancia completa del fenotipo artrítico, evidenciada por el hecho de que todos los descendientes transgénicos desarrollan artritis. En el cruce mostrado en el panel inferior de la Figura 5, también se observa una penetrancia completa del fenotipo artrítico, cuando el animal hembra no transgénico tiene un genoma cogénico que incluye los loci del CPH de la cepa NOD (B6.H2^{nod}).

La Figura 6 contrasta una radiografía (imagen de rayos X) de la extremidad trasera de un ratón artrítico transgénico KRN x NOD (panel derecho) con una radiografía de la extremidad trasera de un hermano de camada no transgénico, no artrítico (panel izquierdo).

La Figura 7 muestra el efecto del anticuerpo monoclonal anti-CD4 para impedir la aparición de la artritis en ratones artríticos transgénicos, comparado con la aparición de la artritis en ratones artríticos transgénicos testigos sin tratamiento. El progreso de la artritis se determinó mediante el examen clínico de los animales cada tercer día.

Descripción detallada de la descripción

Términos y símbolos

Para los fines de esta descripción, en esta memoria se emplean las siguientes abreviaturas, definiciones, designaciones genéticas y secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción a menos que se indique de otro modo.

ES 2 321 036 T3

TABLA 1

Abreviaturas

Ag =	antígeno
APC =	célula presentadora de antígeno
BPR =	ribonucleasa pancreática bovina
CD =	grupo de diferenciación
ADNc =	ácido desoxirribonucleico complementario
D =	diversidad (segmento génico)
ADN =	ácido desoxirribonucleico
EAE =	encefalomielitis alérgica experimental
ES =	células madre embrionarias
FCS =	suero de ternera fetal
HLA =	antígeno de linfocito humano
HPLC =	cromatografía líquida de alta presión
Ig =	inmunoglobulina
J =	de unión (segmento génico)
CPH =	complejo principal de histocompatibilidad
ARNm =	ácido ribonucleico mensajero
MS =	esclerosis múltiple
NOD =	diabético no obeso (cepa de ratones)
PASA =	autoantígeno artrítico polipeptídico
PCR =	reacción en cadena de la polimerasa
RA =	artritis reumatoide
RNA =	ácido ribonucleico
ARNasa =	ribonucleasa
ReA =	artritis reactiva
REN =	endonucleasa de restricción
TCR =	receptor de linfocito T
Tg =	transgénico
ARNt =	ácido ribonucleico de transferencia
V =	variable (segmento génico)

Glosario

Cromatografía de afinidad: Cromatografía en la cual la sustancia relativamente inmovilizada tiene una afinidad hacia un componente específico de la mezcla que se está cromatografiando.

Secuencia de aminoácidos: La secuencia de un polipéptido dado en el orden desde el extremo amino terminal (extremo N-terminal), al extremo carboxi terminal (extremo C-terminal). Sinónimo de “secuencia polipeptídica”, “secuencia peptídica”, “secuencia proteica” o “secuencia proteica primaria.”

Animal: (1) Excluye a los seres humanos, de forma individual y colectiva, en todas las etapas del desarrollo, incluyendo las etapas embrionarias y fetales, a menos que se indique de otro modo; y (2) incluye todos los demás animales vertebrados, incluyendo un animal individual en cualquier etapa del desarrollo, incluyendo las etapas embrionarias y fetales. “Animal no humano” tiene el mismo significado que “animal”.

Modelo animal: Un animal no humano que reproduce fielmente una enfermedad humana y en el que se pueden evaluar composiciones terapéuticas potenciales o composiciones potencialmente peligrosas, para estudiar sus efectos sobre la enfermedad.

Anticuerpo: Una molécula proteica sintetizada por un linfocito B después de la exposición a un antígeno capaz de combinarse específicamente con ese antígeno. Sinónimo de inmunoglobulina (Ig).

Antígeno: Una molécula o una composición que (1) induce una respuesta inmune en un animal, y (2) interacciona específicamente con componentes que reconocen al antígeno de un sistema inmune de un animal inmune.

Autoantígeno: Una molécula o una composición endógena normal en un animal que es un antígeno en una enfermedad autoinmune. Sinónimo de antígeno propio.

Biomolécula: Una molécula producida por un organismo vivo. Sinónimo de “molécula biológica”.

Síntesis bioquímica: La producción sintética de una biomolécula en donde las otras biomoléculas se emplean en la producción.

Biosíntesis: La producción de una biomolécula en un organismo vivo.

Vehículo: Una molécula requerida junto con un hapteno, para que tenga lugar una respuesta inmune frente el hapteno. Es decir, una molécula que pone un hapteno en un contexto molecular en el cual el hapteno potencia su inmunogenicidad.

Síntesis química: La producción sintética de una biomolécula en ausencia de cualquier otra biomolécula y sin requerir el uso de cualquier otra biomolécula.

Cromatografía: Un procedimiento caracterizado por el flujo uniforme e ininterrumpido de una mezcla (gas o líquido) a través de una región de una fase estacionaria (líquida o sólida), que con diferentes medios, permite la migración diferencial de los componentes de la mezcla.

Etiqueta detectable: Un resto químico que está acoplado a una biomolécula para permitir la detección de la biomolécula y que se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en una radioetiqueta, una enzima tal y como la peroxidasa de rábano picante o la fosfatasa alcalina, la estreptavidina, la biotina, un epítipo reconocido por un anticuerpo y sus equivalentes.

Marcado de forma detectable: Un estado de una biomolécula en el que la biomolécula tiene una etiqueta detectable unida covalente a ella misma.

Enfermedad: (1) Excluye la gestación por sí misma, pero no las enfermedades autoinmunes asociadas con la gestación, y (2) incluye cualquier estado anormal de un organismo o de una parte, especialmente como consecuencia de una infección, una debilidad inherente, estrés ambiental, que perjudique un funcionamiento fisiológico normal.

Secuencia de ADN: La secuencia de bases de nucleótidos contiguos de una hebra de ADN, tal y como se lee de 5' a 3'. Sinónimo de “molécula de ADN”.

Enzima: Proteína que es un catalizador para una reacción química específica, a menudo una que implica unas o varias biomoléculas como sustratos y/o productos. A diferencia de los catalizadores no biológicos obtenidos, las enzimas pueden reconocer un sustrato con estereoespecificidad, es decir, algunas enzimas son capaces de reconocer y, de este modo, de catalizar la reacción química de, solamente uno de una pareja de enantiómeros L y D.

Epítipo: Una parte de un antígeno que interacciona específicamente con los componentes que reconocen un antígeno del sistema inmunológico de un animal. En un antígeno polipeptídico, los epítipos pueden corresponderse a

las secuencias cortas de aminoácidos contiguos; los restos del antígeno se denominan el vehículo. Es sinónimo de determinante antigénico.

5 *Vector de expresión:* Una secuencia de ADN artificial o una secuencia de ADN presente en la naturaleza, que se ha modificado artificialmente, en la que se pueden insertar genes extraños o anormales, para estudiar su expresión en organismos hospedadores apropiados para el vector.

10 *Extraño o anormal:* No endógeno para un animal de tipo silvestre sano. “Los antígenos extraños o los endógenos pero anormales” designan biomoléculas frente a las que se tiene que generar una respuesta inmune y que incluyen biomoléculas procedente de agentes patógenos invasivos y biomoléculas codificadas por el animal, presentes sobre en células cancerígenas o infectadas; sinónimo de “no propio”. “Los genes extraños o anormales” designan secuencias de ADN que no son endógenas en el genoma de un animal, o las secuencias de ADN obtenidas a partir de un animal, pero que se han reorganizado, mutado o modificado genéticamente de otra manera, de modo que poseen unas propiedades (p. ej., ubicación genómica, regulación de la expresión, número de copias) que no poseen las secuencias de ADN
15 endógenas a partir de las cuales se han obtenido.

Gen: Una secuencia de ADN que consiste en un gen estructural, p. ej., un marco de lectura que codifica una secuencia polipeptídica, según el código genético convencional (Tabla 2); y elementos de expresión, p. ej., promotores, terminadores, intensificadores, etc., requeridos para la transcripción del gen estructural.

20 *Modificado genéticamente:* Sometido a manipulación humana, destinada a introducir un cambio genético.

Hapteno: Una molécula pequeña que (1), por sí misma, no puede inducir una respuesta inmune en un animal, (2) puede inducir una respuesta inmune en un animal, junto con un vehículo al cual está unida, e (3) interacciona específicamente con los componentes que reconocen el antígeno del sistema inmune de un animal inmune.

Animal hospedador: Un animal que alberga genes extraños y/o anormales, introducidos como resultado de (1) una invasión con células del animal a través de un parásito intracelular natural o modificado genéticamente; o (2) una introducción en las células de genes extraños o anormales mediante manipulación humana.

30 *Animal inmune:* Un animal al que se ha presentado una cantidad inmunizante de antígeno y que ha generado frente a él una respuesta inmune humoral y/o mediada por células.

Isoesquízómero: Una enzima de un conjunto de enzimas de restricción que son funcionalmente equivalentes, en virtud de que cada una tiene la misma secuencia de reconocimiento.

Mamífero: (1) Excluye a los seres humanos, individual y colectivamente, en todas las etapas del desarrollo, incluyendo las etapas embrionarias y los estados fetales, a menos que se indique de otro modo; y (2) incluye todos los demás animales que sean miembros de la clase de vertebrados *Mammalia*, incluyendo un animal aislado en cualquier etapa del desarrollo, incluyendo las etapas embrionarias y fetales, que se distingue por la autorregulación de la temperatura del cuerpo, tener pelo y, en las hembras, las mamas que producen leche.

Anticuerpo monoclonal: Una molécula de anticuerpo única y aislada, producida por un hibridoma.

45 *Anticuerpo monoespecífico:* Un anticuerpo policlonal producido como una respuesta inmunológica a un sólo epítopo o a varios, que se encuentran en (1) un antígeno corto, aislado, sintético o (2) un hapteno corto, aislado, unido a un vehículo.

Anticuerpo policlonal: Una composición que comprende un surtido de diferentes anticuerpos, que reconocen todos ellos un antígeno particular.

50 *Polipéptido:* Un polímero de residuos de aminoácidos.

Proteína: Una biomolécula que comprende uno o varios polipéptidos dispuestos en una forma funcional, tridimensional.

Biosíntesis recombinante: Síntesis en un organismo que está dirigida hacia una biomolécula concreta, mediante la introducción natural de material genético que codifica la biomolécula.

60 *Endonucleasa de restricción:* Una endonucleasa que escinde el ADN cada vez que aparece en el mismo una secuencia de reconocimiento específica. Sinónimo de “enzima de restricción”.

Transgén: Un gen que no existe de forma natural en un animal, es decir, un gen extraño o anormal, introducido en un animal por medios artificiales, es decir, mediante manipulación humana.

65 *Animal transgénico:* Un animal en el que se han introducido, por medios artificiales, es decir, mediante manipulación humana, uno o varios transgenes.

ES 2 321 036 T3

TABLA 2

El código genético

<i>Primera posición (extremo 5')</i>	<i>Segunda posición</i>				<i>Tercera posición (extremo 3')</i>
U	U	C	A	G	
	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Detención	Detención	A
	Leu	Ser	Detención	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

A lo largo de la descripción, las abreviaturas para los residuos de aminoácidos y de nucleótido presentes, respectivamente, en secuencias polipeptídicas y de ácidos nucleicos, son tal y como se han descrito en 37 C.F.R. § 1.822, revisado con fecha 1 de julio de 1993.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 3. SECUENCIAS DE RECONOCIMIENTO DE REN	
REN	Secuencia de Reconocimiento
BamHI	GGATCC
EcoRI	GAATTC
EcoRV	GATATC
KpnI	GGTACC
NdeI	CATATG
NruI	TCGCGA
NotI	GCGGCCGC
PstI	CTGCAG
SacII	CCGCGG
Sall	GTCGAC
XhoI	CTCGAG
XmaI	CCCGGG

Descripción detallada de la descripción

La invención se basa en el descubrimiento inesperado de que ratones que tienen un repertorio sustancialmente limitado de receptores de linfocitos T, muestran un fenotipo que comprende selectivamente síntomas graves clásicos de la artritis reumatoide. El repertorio de TCRs de los ratones artríticos, aunque está limitado, es funcionalmente viable. El repertorio de TCRs limitado de los ratones artríticos, consiste en una parte sustancial de los TCRs que reconocen uno o varios epítomos de los autoantígenos artritogénicos polipeptídicos endógenos. En una realización preferida, definida en las reivindicaciones, los repertorios limitados de TCRs de los ratones artríticos son el resultado de la inserción en el genoma de los animales, de los transgenes que codifican las subunidades α y β de TCR que se combinan en los linfocitos T de los animales transgénicos resultantes, para formar un TCR que se une a un antígeno que comprende uno o varios epítomos de un oligopéptido que se corresponde con los aminoácidos 41-61 de la ribonucleasa pancreática bovina (BPR) y que tiene la secuencia de aminoácidos

Lys-Pro-Val-Asn-Thr-Phe-Val-His-Glu-Ser-Leu-Ala-Asp-Val-Gln-Ala-Val-Cys-Ser-Gln-Lys [SEQ ID NO. 1],

y/o uno o varios epítomos de una proteína que comprenden los autoantígenos artritogénicos polipeptídicos endógenos que tienen sustancialmente una reacción cruzada con los del oligopéptido obtenido a partir de BPR, tal y como se define en las reivindicaciones.

Los ratones de la invención comprenden cualquier ratón, tal y como se define en las reivindicaciones, que tenga un fenotipo artrítico como resultado de la expresión transgénica de las subunidades que reconocen el antígeno de un receptor de linfocitos T que reconoce y/o se une a uno o a varios epítomos de los aminoácidos 41-61 de la ribonucleasa pancreática bovina y/o de los autoantígenos artritogénicos polipeptídicos endógenos (PASAs).

Los ratones transgénicos de la invención son animales en los cuales se ha introducido por medios artificiales (es decir, mediante manipulación humana), uno o varios genes que no están presentes de forma natural en el animal, p. ej., genes extraños, genes endógenos manipulados genéticamente, etc., tal y como se define en las reivindicaciones. Los genes introducidos artificialmente, conocidos como transgenes, pueden ser de la misma especie o de una especie diferente a la del animal, pero que no se encuentren de forma natural en la configuración y/o en el locus cromosómico conferido por el transgen. Los transgenes pueden comprender secuencias de ADN extrañas, es decir, secuencias que no se encuentran normalmente en el genoma del animal hospedador. Alternativa o adicionalmente, los transgenes pueden comprender secuencias de ADN endógenas que son anormales porque se han reorganizado o mutado *in vitro* para alterar el patrón normal *in vivo* de la expresión del gen, o para alterar o eliminar la actividad biológica de un producto génico endógeno, codificado por el gen. Watson, J. D. y col., "La introducción de genes extraños en ratones", en *Recombinant DNA*, 2ª edición., W. H. Freeman & Co., Nueva York (1992), págs. 255-272; Gordon, J. W., *Intl. Rev. Cytol.* 115:171-229 (1989); Jaenisch, R., *Science* 240:1468-1474 (1989); Rossant, J., *Neuron* 2:323-334 (1990).

Los ratones transgénicos de la invención se producen introduciendo transgenes en la línea germinal del ratón. Las células embrionarias diana en las diferentes etapas de desarrollo, se emplean para introducir los transgenes de la invención. Se emplean diferentes métodos, dependiendo de la etapa del desarrollo de la(s) célula(s) diana(s) embrionaria(s).

5 1. La microinyección de cigotos es el método preferido para incorporar los transgenes en los genomas de animales, en el curso de la puesta en práctica de la invención. Un cigoto, un óvulo fecundado que no ha sufrido una fusión de los pronúcleos o una división celular subsiguiente, es la célula diana preferida para la microinyección de secuencias de ADN transgénicas. El pronúcleo masculino del mórfo alcanza un tamaño de aproximadamente 20 micrómetros de diámetro, una característica que permite la inyección reproducible de 1-2 picolitros de una solución que contiene
10 secuencias de ADN transgénicas. El uso de un cigoto para la introducción de transgenes, tiene la ventaja de que, en la mayoría de los casos, las secuencias de ADN transgénico inyectadas se incorporarán en el genoma del animal hospedador antes de la primera división celular. Brinster y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82:4438-4442 (1985). Por consiguiente, todas las células de los animales transgénicos resultantes (animales precursores) son portadores estables de un transgén incorporado en un locus genético particular, designado como alelo transgénico. El alelo transgénico
15 muestra la herencia mendeliana: la mitad de los descendientes, resultado del cruce de un animal transgénico con un animal no transgénico, heredarán el alelo transgénico, de acuerdo con las leyes de Mendel de transmisión aleatoria.

2. La integración vírica se puede emplear para introducir los transgenes de la invención en un animal. Los embriones que se están desarrollando, se cultivan *in vitro* hasta la etapa de desarrollo conocida como blastocito. En ese momento, los blastómeros se pueden infectar con retrovirus apropiados. Jaenich, R., *Proc. Natl. Sci. (USA)* 73:1260-1264. La infección de los blastómeros se intensifica eliminando enzimáticamente la zona pelúcida. Hogan y col., en "Manipulando el embrión de ratón", Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1986). Los transgenes se introducen mediante vectores víricos que son típicamente defectuosos para la replicación, pero que siguen siendo competentes para integrar las secuencias de ADN asociadas a virus, incluyendo las secuencias de ADN transgénicas,
25 ligadas a tales secuencias víricas, en el genoma del animal hospedador. Jahner y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82:6927-6931 (1985); Van der Putten y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82:6148-6152 (1985). La transfección se obtiene fácil y eficientemente mediante el cultivo de los blastómeros en una monocapa de células que producen el vector vírico que contiene el transgen. Van der Putten y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82:6148-6152 (1985); Stewart y col., *EMBO Journal* 6:383-388 (1987). Alternativamente, la infección se puede realizar en un estado posterior, por ejemplo un blastocelo. Jahner, D. y col., *Nature* 298:623-628 (1982). En cualquier caso, los animales precursores más transgénicos, producidos mediante integración vírica, serán mosaicos para el alelo transgénico; es decir, el transgén se incorpora solamente en un subconjunto de todas las células que forman el animal transgénico precursor. Por otra parte, los eventos de la integración vírica múltiple pueden tener lugar en un único animal precursor, generando
30 otros transgénicos múltiples que se segregarán en las generaciones futuras de los descendientes. La introducción de transgenes en las células de la línea germinal mediante este método, es posible pero ocurre probablemente con una frecuencia baja. Jahner, D. y col., *Nature* 298:623-628 (1982). Sin embargo, una vez que se ha introducido un transgén en las células de la línea germinal con este método, se pueden producir descendientes en los que esté presente un alelo transgénico en todas las células del animal, es decir, en las células de la línea somáticas y germinal.

3. Las células madre embrionarias (ES) también pueden servir como células diana para introducir los transgenes de la invención en animales. Las células ES se obtienen a partir de embriones implantados previamente, que se cultivan *in vitro*. Evans, M. J. y col., *Nature* 292:154-156 (1981); Bradley, M. O. y col., *Nature* 309:255-258 (1984); Gossler y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83:9065-9069 (1986); Robertson y col., *Nature* 322:445-448 (1986). Las células ES que se han transformado con un transgen, se pueden combinar con un blastocisto del animal, después de lo cual las
45 células ES colonizan el embrión y participan en la línea germinal del animal resultante, que es una quimera (compuesta de células obtenidas a partir de dos o varios animales). Jaenisch, R., *Science* 240:1468-1474 (1988). De nuevo, una vez que se ha introducido un transgén en las células de la línea germinal según este método, se pueden producir descendientes en los que el alelo transgénico está presente en todas las células del animal, es decir, en las células de la línea somática y germinal.

50 Aunque la introducción inicial de un transgén es un evento lamarquiano (no mendeliano), los transgenes de la invención pueden estar integrados de forma estable en las células de la línea germinal y transmitirse a la descendencia del animal transgénico en forma de locus mendelianos. Otras técnicas transgénicas dan como resultado animales transgénicos mosaicos, en los cuales algunas células son portadoras de los transgenes y otras células no. En los animales transgénicos mosaicos, en los cuales las células de la línea germinal no son portadoras de los transgenes, no tiene lugar la transmisión de los transgenes a la descendencia. Sin embargo, los animales transgénicos mosaicos son capaces de mostrar fenotipos asociados a los transgenes.

Los transgenes se pueden introducir en animales para proporcionar modelos de animales para las enfermedades
60 humanas. Los transgenes que se obtienen como resultado de tales modelos animales, incluyen, p. ej., los transgenes que codifican productos génicos mutantes, asociados con un error innato del metabolismo en una enfermedad genética humana y los transgenes que codifican un factor humano requerido para conferir susceptibilidad a un agente patógeno humano (es decir, una bacteria, un virus u otro microorganismo patógeno). Leder, P. y col., documento de patente de EE.UU., número 5.175.383 (29 de diciembre de 1992); Kindt, T. J. y col., documento de patente de EE.UU. número 5.183.949 (24 de febrero de 1993); Small, J. A. y col., *Cell* 46:13-18 (1986); Hooper, M. y col., *Nature* 326:292-295 (1987); Stacey, A. y col., *Nature* 332:131-136 (1988); Windle, J. J. y col., *Nature* 343:665-669 (1990); Katz, J. D. y col., *Cell* 74:1089-1100 (1993). Los animales transgénicos que están predispuestos a padecer una enfermedad, se pueden utilizar para identificar composiciones que inducen la enfermedad y para evaluar el potencial patógeno de

las composiciones conocidas para inducir la enfermedad. Berns, A. J. M., documento de patente de EE.UU., número 5.174.986 (29 de diciembre de 1992).

En el fondo apropiado de la cepa, los transgenes de la invención confieren un fenotipo artrítico grave a los ratones transgénicos, mientras que se desarrollan. Aunque el genotipo transgénico se transfiere de forma reproducible a los descendientes de una manera mendeliana, la capacidad del fenotipo transgénico (es decir, artritis) de manifestarse completamente, varía en diferentes fondos genéticos. Con la puesta en práctica de la invención, es deseable mantener los transgenes de la invención en ratones hospedadores que pertenecen a una cepa en la cual, debido al fondo genético particular de la cepa, el genotipo transgénico no manifieste su fenotipo artrítico perjudicial, a un nivel detectable o significativo. Una línea de ratón transgénico en la que el transgén se mantiene y se hereda como un locus mendeliano, pero en la que se reduce o se inhibe la manifestación de un fenotipo transgénico perjudicial, se conoce como una línea de mantenimiento transgénica.

Durante la puesta en práctica de la invención, se cruzaron ratones de la línea de mantenimiento transgénica con ratones que tenían un fondo genético en el que el transgén manifiesta completamente un fenotipo artrítico perjudicial. Los descendientes que han heredado los transgenes de la invención, y que desarrollarán por tanto la artritis, se distinguen de los hermanos de la camada que no han heredado los transgenes, mediante un análisis del material genético de los descendientes, para estudiar la presencia de biomoléculas que comprenden secuencias únicas, correspondientes a secuencias de los transgenes de la invención o que están codificadas por los mismos. Por ejemplo, los líquidos biológicos que contienen polipéptidos codificados únicamente por los transgenes de la invención, se pueden someter a inmunoensayo para estudiar la presencia de los polipéptidos. Una manera más simple y fiable para identificar los descendientes transgénicos, comprende obtener una muestra de tejido de una extremidad de un animal, p. ej., de la cola, y analizar la muestra para estudiar la presencia de secuencias de ácidos nucleicos, correspondientes a la secuencia de ADN de una porción o de porciones únicas de los transgenes de la invención. La presencia de tales secuencias de ácido nucleico se puede determinar, p. ej., mediante un análisis de hibridación ("Southern") con las secuencias de ADN correspondientes a porciones únicas del transgen, mediante un análisis de los productos de reacciones PCR, usando secuencias de ADN en una muestra como sustratos y oligonucleótidos obtenidos a partir de la secuencia de ADN del transgen, etc.

Una colección de un animal de diversos receptores de linfocitos T, teniendo cada uno una subunidad α y β con regiones variables únicas, se denomina el repertorio de TCRs. En un animal aislado, incluyendo un ser humano, con un sistema inmune, de tipo silvestre no suprimido, el repertorio de TCRs confiere al sistema inmune la capacidad de identificar correctamente millones de antígenos diferentes. Las técnicas de la genética molecular, tales como la amplificación con PCR y la determinación de la secuencia de moléculas de ADN que codifican las regiones variables de genes funcionalmente reorganizados del TCR, se pueden utilizar para examinar el repertorio de TCRs de un animal individual. Uematsu, Y., *Immunogenet.* 34: 174-178 (1991). De manera similar, se puede examinar el repertorio de TCRs en un tejido particular o en un fluido biológico particular. Oksenberg, J. R. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 86:988-992 (1989); Oksenberg, J. R. y col., *Nature* 345:344-346 (1990) y la errata, *Nature* 353:94 (1991); Uematsu, Y. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 88:534-538 (1991); Panzara, M. A. y col., *Biotechniques* 12:728-735 (1992). La introducción de los transgenes de la invención, que codifican subunidades de TCR funcionalmente reorganizadas, en un animal, produce como resultado un animal en el cual el repertorio de TCRs consiste sustancialmente en los TCRs expresados por el transgen. En los animales con TCRs transgénicos, los genes endógenos para las subunidades de TCR no se expresan, debido a los fenómenos conocidos como exclusión alélica. Alt, F. W. y col., *Cell* 21:1-12 (1980); Early, P. y Hood, L., *Cell* 24:1-3 (1981). La expresión de un gen de TCR β reorganizado funcionalmente en ratones transgénicos, impide la expresión de los genes endógenos de TCR β , al parecer inhibiendo completamente la unión de V-D-J. Weaver, D. y col., *Cell* 42:117-127 (1985); Krimpenfort, P. y col., *EMBO Journal* 7:745-750 (1988); Uematsu, Y. y col., *Cell* 52:831-841 (1988). La expresión transgénica de una cadena de TCR β reorganizada funcionalmente, que carece de una región variable, inhibe los alelos endógenos de TCR β y bloquea de este modo la maduración normal de los linfocitos T. Krimpenfort, P. y col., *Nature* 341:742-746 (1988); Krimpenfort, P. J. A. y col., documento de patente de EE.UU., número 5.175.384 (29 de diciembre de 1992). Sin embargo, la expresión de una cadena de TCR α funcionalmente reorganizada no evita siempre la reorganización y la expresión de los genes endógenos de TCR α . Bluthmann, H. y col., *Nature* 334:156-159 (1988); Borgulya, P. y col., *Cell* 69:529 (1992). Así, la expresión transgénica en un animal con un gen TCR α funcionalmente reorganizado y un gen de TCR β funcionalmente reorganizado que comprende una región variable, da como resultado un animal transgénico que tiene un repertorio de TCRs funcionalmente viable, no obstante limitado. Así, en los animales transgénicos de la invención, los TCRs compuestos por las dos subunidades de TCR codificadas por transgenes, predominarán sobre otros tipos de TCRs.

Los transgenes de la invención se pueden obtener aislando o amplificando secuencias de ADN procedentes de fuentes genómicas, mediante la preparación de moléculas de ADNc a partir de moldes de ARNm, mediante la síntesis química o bioquímica, o combinaciones de las técnicas anteriores. Las porciones estructurales de los transgenes de la invención comprenden exones, que comprenden porciones de los marcos de lectura para las subunidades TCR α y TCR β en particular, separadas por intrones que no codifican TCR. Los intrones se separan de las moléculas maduras de ARNm y las secuencias de aminoácidos correspondientes a los intrones que no aparecen en las proteínas, lo que es el resultado de la biosíntesis dirigida por secuencias de ARNm maduro. Chambon, P., *Sci. American* 244:60-71 (1981). Las porciones estructurales de los transgenes de la invención codifican subunidades de TCR α y TCR β que comprenden las regiones variables que componen, en la molécula de TCR ensamblada, una región variable que se une a un antígeno que comprende uno o varios epítomos de un oligopéptido correspondiente a los aminoácidos 41-61 de la ribonucleasa pancreática bovina (BPR) y que tiene la secuencia de aminoácidos

Lys-Pro-Val-Asn-Thr-Phe-Val-His-Glu-Ser-Leu-Ala-Asp-Val-Gln-Ala-Val-Cys-Ser-Gln-Lys [SEQ ID NO. 1],

y/o uno o varios epítomos de proteínas que comprenden los autoantígenos artríticos, polipeptídicos endógenos, que reaccionan sustancialmente de forma cruzada con los epítomos del oligopéptido obtenido a partir de BPR.

Para que se expresen, las porciones estructurales de los transgenes de la invención, se tienen que acoplar a un promotor en una disposición funcional. El promotor no tiene que ser un promotor presente en la naturaleza. Se pueden emplear diferentes tipos de promotores, dirigidos a diferentes niveles de expresión para modular el grado de artritis en los animales transgénicos de la invención. Si se desea emplear un promotor constitutivo, se prefiere un promotor vírico, tal como el promotor temprano de SV40. Otros promotores pueden ser semi-constitutivos o semi-inducibles, es decir, que tengan un nivel de expresión basal que se pueda incrementar administrando a los animales transgénicos, composiciones inductoras particulares. Un promotor realmente inducible, es decir, uno que sólo funciona cuando están presentes las composiciones inductoras particulares, se puede emplear si se desea un control riguroso de la expresión. Elementos reguladores adicionales asociados al promotor se pueden incluir para potenciar, disminuir o limitar temporal o histológicamente la expresión de los transgenes de la invención. De este modo, las características bioquímicas, celulares, inmunológicas y biológicas de la artritis generada en los animales artríticos transgénicos de la invención, se pueden manipular o controlar para producir variantes útiles de las mismas.

Los métodos inmunológicos a través de los cuales también se puede poner en práctica la invención, incluyen la inmunización del animal no humano con un polipéptido que comprende los aminoácidos 41-61 de la ribonucleasa pancreática bovina, o una proteína aislada que comprende autoantígenos artríticos, polipeptídicos (PASAs), o polipéptidos sintéticos que tienen secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína que comprende PASA aislada, de la invención. Alternativamente, la transferencia de los linfocitos T procedentes de animales artríticos transgénicos de la invención, a un animal no transgénico, se puede emplear para establecer una respuesta autoinmune en el mismo. Los animales artríticos producidos con estos métodos inmunológicos muestran, sin embargo, su estado artrítico con un nivel menor de capacidad de reproducción y de previsión del curso de la enfermedad que los animales artríticos transgénicos de la invención.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de los Ejemplos y de las reivindicaciones.

Ejemplos

Los siguientes Ejemplos sirven solamente para ilustrar la invención, y no se deben interpretar en ningún modo como una limitación de la invención.

Ejemplo 1

Construcción de transgenes que codifican subunidades de TCR de 28

Este ejemplo describe la producción de secuencias de ADN aisladas que codifican las subunidades α y β del receptor de linfocitos T presentado por las células R28, y las estructuras artificiales del transgén obtenidas a partir de las mismas.

Secuencias de ADN que codifican subunidades de TCR procedentes del hibridoma R28

R28, también designado de forma informal RNAsa 37, es un hibridoma de linfocitos T de múridos, obtenido a partir de un ratón B10.A(4R) inyectado con un oligopéptido que se corresponde con los aminoácidos 41-61 de la ARNasa pancreática bovina (BPR). Peccoud, J. y col., *EMBO Journal* 9:4215-4223 (1990). *In vitro*, el TCR presentado en R28 responde al oligopéptido obtenido a partir de BPR, cuando lo presenta una APC que muestra la molécula A^k del CPH. Cuando se emplean APCs que presentan una molécula mutante A^k de CPH, R28 reconoce con una reacción cruzada un antígeno peptídico sin caracterizar que está presente en el suero de ternera fetal o cuya síntesis está favorecida por el suero de ternera fetal, pero que no es un oligopéptido de BPR o bien obtenido a partir de BPR. Dellabona, P. y col., *Eur. J. Immunol.* 21:209-213 (1991).

Las secuencias de ADNs que codifican muchos segmentos diferentes de V, D y J para las subunidades de Ig, están presentes en múltiples copias sin expresar en el ADN de la línea germinal; una colección diferente pero análoga de los segmentos para las subunidades de TCR, también está presente. Por ejemplo, en el genoma de múridos, el locus del gen de la subunidad TCR β contiene dos regiones C β casi idénticas, reorganizadas aleatoriamente, cada una de las cuales está precedida por un segmento D y seis segmentos J; el locus de TCR β también contiene 20 a 30 segmentos V. Davis, M. M. y Bjorkman, P. J., *Nature* 334:395-402 (1988). Durante el desarrollo de un animal, se generan diversas regiones variables en las células individuales del sistema inmune, mediante la unión aleatoria de diferentes segmentos génicos de V, D y J (para TCR β), o V y J (para TCR α). Al mismo tiempo o aproximadamente al mismo tiempo, uno o varios nucleótidos se insertan en los puntos de unión de los segmentos génicos, generando una diversidad adicional en los segmentos génicos que codifican las regiones variables, particularmente en el caso de las regiones variables de TCR. Sakano, H. y col., *Nature* 280:288-294 (1979); Early, P. y col., *Cell* 19:981-992 (1980); Davies, M. M. y Bjorkman, P. J., *Nature* 334:395-402 (1988).

Las regiones variables y de unión, reorganizadas funcionalmente, de ambas cadenas α y β de TCR, se clonaron y se secuenciaron según procedimientos convencionales. Un gen de una subunidad de TCR o de Ig, funcionalmente reorganizado, es uno en el cual las reorganizaciones del ADN han dado como resultado un gen expresado que codifica una subunidad funcional de TCR o de Ig, es decir, una subunidad que no se termina prematuramente durante biosíntesis porque el marco de lectura ha sido alterado, o se ha introducido un codón de detención en el marco de lectura, mediante eventos de unión de V-D-J (subunidad grande) o eventos de unión de V-J (subunidad pequeña), y/o una mutación somática. Aunque la región variable de las subunidades de TCR varía de un linfocito T a otro, la región constante permanece la misma. Así, la determinación de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de las subunidades TCR α y TCR β , junto con la secuencia de aminoácidos conocida de las regiones constantes de las subunidades, define una única molécula funcional de TCR. Kappler, J. y col., *Cell* 35:295-302 (1983); Sim, G. K. y col., *Nature* 312:771-775 (1984); Acuto, O. y Reinherz, E. L., *New England J. Med.* 312:1100-1110 (1985); Yague, J. y col., *Nucl. Acids Res.* 16:11355-11364 (1988).

El análisis de las secuencias de ADN que codifican las regiones variables de las subunidades de TCR procedentes de R28, revela que la secuencia variable de TCR α se obtiene a partir de V α 1 y la secuencia variable de TCR β se obtiene a partir de V β 6 (Figura 1, paneles A y B). Las secuencias únicas de aminoácidos de las regiones variables de TCR α [SEQ ID No 5] y TCR β [SEQ ID No. 7] son útiles para diseñar composiciones terapéuticas (véase más abajo). Equivalentes de las secuencias de ADN que codifican la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de las subunidades del TCR de R28 [SEQ ID No. 4 y 6], se producen sustituyendo los codones que son equivalentes, es decir, que codifican los mismos residuos de aminoácidos que los otros, según el código genético convencional (Tabla 2).

Estructura de los transgenes

Dos fragmentos de ADN, procedentes de los plásmidos paKRN y pbKRN, se emplearon para generar la línea transgénica KRN. Ambos plásmidos contienen secuencias de ADN obtenidas inicialmente a partir del hibridoma R28. Peccoud, J. y col., *EMBO Journal* 9:4215-4223 (1990). Las regiones variable y de unión funcionalmente reorganizadas, tanto de la cadena α como la β del TCR, se insertaron en sitios apropiados de vectores de casetes que se habían diseñado de modo que permitieran la inserción apropiada de regiones variables de TCR funcionalmente reorganizadas, en los genes de la subunidad de TCR que están ligados funcionalmente con secuencias de expresión del murido, después de la introducción en ratones transgénicos.

Las estructuras de los plásmidos resultantes, paKRN y pbKRN, se muestran en las Figuras 1A y 1B, respectivamente, junto con las secuencias de nucleótidos exactas de los fragmentos génicos funcionalmente reorganizados que codifican la región variable de cada subunidad de TCR. Cada plásmido contiene secuencias de ADN que codifican una subunidad de TCR específica y las señales requeridas para la expresión de las secuencias codificadoras en ratones. El gen de la subunidad α está contenido en paKRN; pbKRN comprende el gen de la subunidad β . Específicamente, paKRN contiene la región promotora V α de TCR, un exón que codifica la región variable V α 4 y los segmentos de unión aislados a partir de R28, un intrón que está ausente en el ARNm maduro, un exón que codifica la región constante C α , y las secuencias de ADN flanqueantes en 3' que incluyen la señal de poliadenilación y otras señales de la expresión en 3'. El plásmido pbKRN tiene básicamente la misma estructura, y contiene la región promotora V β de TCR, un exón que codifica la región variable V β 6 y los segmentos de unión aislados a partir de R28, un intrón que está ausente en el ARNm maduro, un exón que codifica la región constante C β , y secuencias flanqueantes en 3' que incluyen la señal de poliadenilación y otras señales de expresión en 3'.

Las células de *Escherichia coli* que contienen el plásmido paKRN o pbKRN se depositaron bajo el Tratado de Budapest en la "Collection Nationale de Culture de Micro-organismes" (CNCM) del Instituto Pasteur, en la calle del Dr. Roux nº 28, 75724 París Cédex 15, Francia, el 18 de mayo de 1994, y se asignaron los números de entrada I-1413 e I-1414, respectivamente. Después de la publicación de una patente con esta solicitud, el CNCM pondrá los plásmidos a disposición de los peticionarios, de acuerdo con el Tratado de Budapest y las leyes y regulaciones sobre patentes aplicables de los EE.UU. Estos depósitos no otorgan una licencia para la puesta en práctica de la invención, y no se admitirá que los depósitos eran necesarios para satisfacer las leyes de patentes de los EE.UU. o de cualquier otro país.

Ejemplo 2

55 Construcción de una línea transgénica de ratones TCR

Este ejemplo describe la construcción de ratones transgénicos que tienen poblaciones de TCRs que consisten sustancialmente en las subunidades TCR α y TCR β , codificadas por el alelo transgénico KRN. Los ratones transgénicos KRN tienen un repertorio de TCRs funcionalmente viable, aunque limitado.

60 Introducción de los transgenes en el genoma de muridos

Para generar moléculas de ADN adecuadas para el uso en la microinyección, fue necesario eliminar las secuencias de ADN de paKRN y pbKRN que sólo eran necesarias para el mantenimiento de estos plásmidos en células hospedadoras procarióticas. Esto se realizó tratando los plásmidos con la endonucleasa de restricción Sall (paKRN) o KpnI (pbKRN) y aislando el fragmento de restricción pertinente de Sall o de KpnI, respectivamente (véase la Figura 1), mediante electroforesis preparativa en gel de agarosa y electroelución. Los fragmentos de restricción se extrajeron dos veces con fenol-cloroformo, se precipitaron con etanol, y se resuspendieron.

Los fragmentos de restricción aislados que contenían los transgenes de $TCR\alpha$ y $TCR\beta$, se inyectaron en embriones F2 de B6xSJL, de acuerdo con procedimientos convencionales de transgénesis. Hogan, B. y col., "Manipulando el embrión de ratón", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., páginas 1-332 (1986). Los óvulos de ratón fertilizado se recuperaron en agrupaciones de los oviductos de hembras F1 B6xSJL superovuladas, que se habían apareado con los machos una hora antes. Los transgenes $TCR\alpha$ y $TCR\beta$ se inyectaron en el pronúcleo más accesible de cada óvulo fertilizado. Los óvulos microinyectados se implantaron en los oviductos de las madres adoptivas Swiss pseudopregnadas de un día y el embarazo se llevó a término.

Varias semanas después del nacimiento, un precursor transgénico se identificó mediante hibridación de tipo Southern con moléculas de ADN aisladas a partir de las biopsias de la cola de los cachorros. El ratón adoptivo posee un genoma que contiene copias integradas de los genes para ambas subunidades $TCR\alpha$ y $TCR\beta$, y se cruzó con ratones C57B1/6 para establecer la línea de ratón transgénico KRN.

Transmisión de los transgenes

La transmisión mendeliana de un transgén se realiza cruzando un ratón transgénico con un ratón no transgénico. Típicamente, los retrocruzamientos se realizan con ratones C57B1/6, pero también se emplean otras cepas. Los descendientes que son positivos para el transgen, se identifican rutinariamente mediante un análisis citofluorimétrico de los linfocitos de la sangre periférica, con agentes reactivos dirigidos contra el segmento V β 6 (véase más abajo), o mediante un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos. El ensayo de hibridación incluye las etapas de obtener una muestra biológica de cada miembro de la camada, típicamente mediante separación física de los últimos 0,5 a 1,0 centímetros de la cola del ratón, homogeneizando o extrayendo la muestra de la cola, purificando o amplificando sus moléculas de ADN, digiriendo las moléculas de ADN resultantes con la endonucleasa de restricción de EcoRV, separando electroforéticamente las secuencias de ADN restringidas, transfiriendo y ligando las secuencias de ADN restringidas y separadas a un filtro e hibridando las secuencias de ADN unidas al filtro con una sonda de ácido nucleico marcada, de forma detectable que consiste en los fragmentos de XmaI-NotI de aproximadamente 0,7 kb, procedentes de paKRN (Figura 1A). Además o alternativamente, el fragmento de restricción de XhoI de aproximadamente 0,5 kb, procedente de pbKRN, se puede marcar de forma detectable y emplear como una sonda para detectar los descendientes transgénicos.

Un ejemplo representativo de un ensayo de hibridación de un hermano de camada de la descendencia de KRN, se muestra en la Figura 2. La transmisión del transgén es mendeliana; la mitad de la descendencia es positiva para el transgen. Los transgenes α y β están estrechamente ligados sobre un cromosoma de ratón y parece que se han integrado conjuntamente después de la microinyección de las secuencias de ADN transgénicas respectivas. El locus en el cromosoma que comprende los transgenes α y β de TCR se denomina alelo transgénico KRN.

Expresión del alelo transgénico KRN

Se ha sugerido que ambos transgenes α y β se expresan en una gran proporción de linfocitos en los ratones transgénicos, y que los receptores de los linfocitos T compuestos por las subunidades de TCR codificadas de forma transgénica, son los miembros predominantes de un repertorio limitado de TCRs en los animales transgénicos.

Expresión de $TCR\alpha$. La expresión de la subunidad $TCR\alpha$ codificada por el transgén se demostró por dos métodos

Primero, los transcritos de $TCR\alpha$ procedentes de células del nódulo linfático, se amplificaron en masa mediante reacciones con PCR, que emplean oligonucleótidos degenerados para conseguir un muestreo aleatorio del repertorio de $TCR\alpha$. Candéais, S. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 88:6167-6170 (1991). Los productos de la PCR correspondientes a los transcritos amplificados se clonaron en un vector del bacteriófago M13, y las placas que contenían secuencias de ADNc, correspondientes a las subunidades $TCR\alpha$, se revelaron mediante hibridación con una sonda específica del ácido nucleico de $C\alpha$, marcado de forma detectable que comprendía secuencias de ADN procedentes de la región constante $C\alpha$ compartida, es decir,

TTTGTGGTATTGGAAGGGGCCAGAGCACAGAAGTACACG

[SEQ ID No. 8].

Entre los clones de ADNc de $TCR\alpha$, los clones correspondientes a las transcritos codificados por el transgen, se detectaron por hibridación con una sonda específica del transgen, con el ácido nucleico marcado de forma detectable, que consistía en el fragmento XmaI-NotI de aproximadamente 0,7 kb procedente de paKRN (Figura 1A) y que se corresponde con la región de unión V-J reorganizada funcionalmente, contenida en paKRN, que se hibrida específicamente con las secuencias de ADNc obtenidas a partir de la región variable de $TCR\alpha$ codificada por el transgen. De los clones que se detectaron mediante la hibridación con la sonda específica de $C\alpha$, el 97% también se detectó mediante la hibridación con la sonda específica del transgen. Este resultado indica que las secuencias del ARNm correspondientes al transgén codificado por la subunidad $TCR\alpha$, proporcionan una gran mayoría de transcritos de $TCR\alpha$ en los animales transgénicos.

Segundo, se consiguió un suero anti-idiotípico en ratones normales mediante inmunización con las células transgénicas del nódulo linfático. El suero anti-idiotípico contiene anticuerpos policlonales que reconocen un epítipo encontrado en la región variable o próximo a la misma de los TCRs predominantes procedentes de ratones transgénicos KRN.

La especificidad del suero anti-idiotípico para el TCR del hibridoma R28 se verificó mostrando que reconoce específicamente y tiñe hibridomas T y células transfectadas que expresaban las cadenas α y β de TCR procedentes de células R28 u otras linfocitos T, p. ej., KLy 11.10, Tris y BDC2.5. Los linfocitos de CD4⁺ se aislaron a partir de ratones de tipo silvestre y de ratones transgénicos KRN, según métodos convencionales. Wysocki, L. J. y Sato, V. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 75:2844-2848 (1978); Wasik, M. A. y Morimoto, C., *J. Immunol.* 144:3334-3340 (1990); Harriman, G. R. y col., *J. Immunol.* 145:4206-2414 (1990); Koulova, L. y col., *J. Immunol.* 145:2035-2043 (1990). Los linfocitos CD4⁺ se incubaron con una dosis saturadora de los sueros anti-idiotípicos a 4°C durante 15 minutos, se lavaron y se incubaron con anticuerpos de cabra anti-ratón marcados de forma detectable (es decir, marcados con fluorescencia mediante la conjugación con FITC) durante 45 minutos, a 4°C. Después del lavado, las células se fijaron con formaldehído al 1% y se analizaron mediante pases a través de un clasificador de células automático, activado con fluorescencia (p. ej., un FACScan® de Becton-Dickinson). Kung, P. C. y Goldstein, G., documentos de patentes de EE.UU. n° 4.381.295 (26 de abril de 1983), n° 4.364.932 y n° 4.364.936 (ambas del 21 de diciembre de 1982). El análisis citofluorimétrico indica que el suero anti-idiotípico reacciona con una mayoría de los linfocitos CD4⁺ en ratones transgénicos, pero que reacciona con los linfocitos CD4⁺ de animales testigos solamente con intensidad baja (Figura 3, Panel A).

Expresión de TCR β . La expresión del transgén de la cadena TCR β en ratones KRN, se verificó mediante un análisis citofluorimétrico de los linfocitos CD4⁺. Se utilizó el anticuerpo monoclonal RR4.7 (disponible comercialmente en Pharmingen, San Diego, California; número del catálogo: 01361C), que reconoce la secuencia de aminoácidos codificada por el segmento del gen V (V β 6) presente en el TCR β reorganizado funcionalmente del transgén. Tal y como se indica con la reacción con el anticuerpo monoclonal RR4.7, V β 6 estaba presente esencialmente en todos los linfocitos CD4⁺ en los ratones transgénicos (Figura 3, Panel B). Este ensayo se puede utilizar para identificar animales positivos para el transgén en camadas mezcladas.

La especificidad antigénica impartida por los TCRs compuestos por las cadenas α y β del TCR de R28, se pudo detectar en células del nódulo linfático periférico. Se detectó una fuerte proliferación de las células, cuando los linfocitos T del nódulo linfático se incubaban en presencia del oligopéptido obtenido a partir de BPR que tenía la secuencia de aminoácidos

Lys-Pro-Val-Asn-Thr-Phe-Val-His-Glu-Ser-Leu-Ala-Asp-Val-Gln-Ala-Val-Cys-Ser-Gln-Lys [SEQ ID NO. 1]

y las moléculas del CPH que expresaban APC.

Ejemplo 3

Aislamiento y caracterización de ratones artríticos transgénicos

El nuevo modelo transgénico de artritis descrito en esta memoria, no era el resultado de un esfuerzo dirigido hacia ese objetivo. La línea KRN de ratones transgénicos se construyó introduciendo en los ratones, los genes que codificaban las subunidades α y β del receptor de antígenos de linfocitos T (TCR), procedentes de un hibridoma de linfocito T de múrido, reactivo frente a la ARNasa pancreática bovina, para tratar las cuestiones de inmunología fundamental referentes a la selección del repertorio de linfocitos T. En el fondo genético de la cepa de ratones en la que se había introducido inicialmente el transgén KRN, es decir C57B1/6, el transgén no confería un fenotipo anormal. Por supuesto, debido a sus repertorios limitados de TCRs, estos ratones pueden tener una capacidad reducida para organizar respuestas inmunes apropiadas contra los agentes patógenos que, en cualquier caso, son menos frecuentes en el medio ambiente del laboratorio.

Los ratones transgénicos en KRN C57B1/6, se cruzaron espontáneamente a continuación con ratones endogámicos de la cepa NOD. Asombrosamente, todos los descendientes de este cruce que eran positivos para el transgén, desarrollan síntomas graves asociados con la RA en seres humanos, es decir, inflamación crónica y deformación de las articulaciones de las extremidades. Existe un 100% de penetrancia de la enfermedad en los animales NOD transgénicos en KRN, es decir, cada ratón NOD que hereda el alelo transgénico KRN desarrolla artritis, tal y como se muestra en la Figura 5. Los machos están afectados así como las hembras. No existe artritis cuando los ratones transgénicos no tienen el fondo NOD (Figura 5, KRNxB6), y tales ratones se emplean como animales transgénicos de mantenimiento.

Curso clínico de la artritis

La progresión de la artritis en los ratones portadores del transgén KRN y los genes del CPH obtenidos a partir de NOD, necesarios para la penetrancia del genotipo artrítico (véase más abajo), se siguió mediante mediciones del calibre del grosor de la articulación del tobillo de los animales artríticos, un ensayo sencillo que proporciona mediciones que se correlacionan bien con el inicio y la evolución del proceso inflamatorio. Los ratones artríticos transgénicos muestran señales de inflamación de la articulación, que se manifiestan con un comienzo agudo a las tres o cuatro semanas de la edad; no hay señales clínicas evidentes antes de esa edad (Figura 4B). Las articulaciones distales parecen más afectadas que la rodilla o el codo. Las articulaciones se inflaman y enrojecen; la deformación se extiende al cabo de pocas semanas, con la consecuencia esperada de una reducción de la motilidad de la extremidad (véase, la Figura 4A). Este estado persiste durante varias semanas. Después de diez a doce semanas, los síntomas inflamatorios tienden a reducirse algo, pero las deformaciones secuelas principales persisten.

Debido a una reducción importante de la motilidad impartida por la artritis, los ratones NOD transgénicos en KRN son malos reproductores. Sin embargo, se pueden obtener camadas procedentes de progenitores NOD transgénicos en KRN. En la práctica, los animales artríticos se generan manteniendo el transgén KRN en los ratones con el fondo C57B1/6, en los que no se manifiestan los síntomas artríticos y cruzando los ratones positivos para el transgén con ratones NOD. Todos los animales con descendientes positivos para el transgén KRN, que se obtuvieron como resultado de este cruce, desarrollan artritis y se identifican antes del comienzo de los síntomas mediante hibridación del ácido nucleico o un análisis citofluorimétrico.

Radiografía

La radiografía (formación de imágenes con rayos X) se realizó en animales NOD transgénicos en KRN individuales, así como en hermanos de la camada que no eran transgénicos, en diferentes momentos después del comienzo de la enfermedad en los animales transgénicos. La erosión del hueso y del cartílago es claramente visible en la rodilla y en el tobillo (Figura 6), reflejando las grandes deformaciones que eran visibles externamente (compárese con el Panel A de la Figura 4). La osteosíntesis con osteofitosis está muy extendida. En los animales más viejos, existe una reorganización considerable de las articulaciones, lo que es compatible con las deformaciones visibles externamente. La columna vertebral también parece algo afectada en las radiografías.

Histopatología

Las articulaciones de ratones normales o artríticos (NOD transgénicos en KRN) se examinaron mediante un examen histológico de secciones descalcificadas en parafina, de articulaciones de la columna, la rodilla o la pata, después de una tinción con hematoxilina-eosina, de acuerdo con técnicas patológicas convencionales y rutinarias. Stevens, A., en "Teoría y práctica de técnicas histológicas", Bancroft, J. D. y Stevens, A., compiladores, 3ª edición., Churchill Livingstone, Edinburgh, N.Y., págs. 107-118 (1990). Existen señales muy obvias de la inflamación de la articulación en los ratones artríticos transgénicos, que son paralelas a desarrollos en pacientes con RA: hiperplasia sinovial con distintas capas superpuestas de sinoviocitos grandes, infiltración celular polimórfica (granulocitos, linfocitos, plasmocitos), exudado fibrinoso en las articulaciones. La erosión, la destrucción y la resorción del cartílago están extendidas al cabo de unas pocas semanas de la enfermedad. Una vez más, las lesiones son predominantes en las articulaciones distales, claras pero menos activas en la rodilla, y muy discretas en la cadera. La columna también está afectada por infiltrados inflamatorios, pero de forma suave. No hay lesiones histológicas antes de las tres semanas de la edad.

Es importante tener en cuenta que las señales de inflamación o de infiltración no se han detectado en ningún otro órgano examinado. Resumiendo, la respuesta autoinmune en los ratones artríticos transgénicos es grave pero, como en la RA, se limita a los tejidos sinoviales, particularmente el cartílago. Así, el modelo animal artrítico transgénico de la invención, distinto de los modelos animales de RA previamente descritos, reproduce fielmente las características distintivas de la RA humana.

Requisitos para el fenotipo KRN

La observación inicial de la artritis transgénica se realizó en los ratones F1, originados a partir de un cruce entre un ratón portador del alelo transgénico KRN en el fondo C57B1/6 y un ratón endogámico NOD/Lt. Los animales NOD transgénicos en KRN resultantes, tienen alelos mezclados en cada locus genético en sus genomas, lo que consiste en una contribución por partes iguales de los alelos procedentes del progenitor NOD/Lt y del progenitor C57B1/6. Puesto que el alelo transgénico KRN no dio lugar a ningún síntoma artrítico cuando estaba presente en el fondo C57B1/6, los elementos genéticos (es decir, uno o varios alelos) obtenidos a partir del genoma NOD, contribuyen a la inducción de la artritis a través del alelo transgénico KRN.

Para identificar el(los) alelo(s) NOD requerido(s), ratones transgénicos en KRN que no eran NOD, se cruzaron con ratones de la cepa B6.NH-2^{nod} (regalo del Dr. H. Kikutani). La cepa B6.NH-2^{nod} es una cepa quimérica obtenida a partir de las cepas NOD y B6 de ratones. En los ratones B6.NH-2^{nod}, todos los loci genéticos tienen los mismos alelos que B6, a excepción del locus del CPH, que se obtiene a partir de la cepa de ratones NOD. La enfermedad artrítica se manifestó en la progenie del cruce de ratones transgénicos en KRN que no eran NOD y ratones B6.NH-2^{nod}, con la mismas prevalencia y características que en un cruce testigo de ratones transgénicos en KRN y ratones NOD (Figura 5, KRNxB6.NH-2^{nod} y KRNxNOD, respectivamente). En cambio, los descendientes de un cruce entre ratones transgénicos en KRN y ratones B6, no eran artríticos (Figura 5, KRNxB6), y no había ninguna enfermedad artrítica en otras combinaciones genéticas que sometidas a ensayo (es decir, en los cruces de ratones transgénicos en KRN procedentes de las cepas de B10.D2, B10.M, B10.S, B10.BR, B10.A y B10.A (4R)).

Por tanto, la enfermedad artrítica resultante del alelo transgénico KRN se manifiesta totalmente, gracias a los elementos genéticos proporcionados por loci particulares del CPH de diferentes cepas de ratones. Particularmente, el locus del CPH de la cepa NOD de los ratones, produce como resultado una manifestación completa del fenotipo KRN. Los loci del CPH procedentes de otras cepas de ratones, o los loci del CPH procedentes de otros animales incluyendo los seres humanos, se pueden someter a ensayo en el modelo de ratón, para estudiar su capacidad para conseguir el fenotipo KRN (véase más abajo). De este modo, la invención proporciona un método para identificar y aislar locis adicionales del CPH y no obtenidos a partir de NOD, que se puede emplear en la puesta en práctica de la invención.

Inmunología de los ratones artríticos transgénicos

La misma naturaleza del alelo transgénico que dirige la artritis en ratones NOD transgénicos en KRN, implica un papel determinante de los linfocitos T en la enfermedad y, por extensión mediante analogía, en la RA. De hecho, la deleción clónica extensiva de poblaciones de linfocitos T centrales y periféricos de los ratones artríticos transgénicos, tiene lugar durante el desarrollo de los animales. El mecanismo de deleción clónica es muy activo cerca del nacimiento; muy pocos linfocitos T CD4⁺ y de CD8⁺, si es que hay alguno, están presentes en los órganos linfoides periféricos en ese momento. El agotamiento de los linfocitos T tiende a disminuir algo con la edad, y los linfocitos CD4⁺ aparecen en los animales que tienen cerca de tres semanas de edad, en el bazo y en los nódulos linfáticos.

El componente de linfocitos B del sistema inmune de ratones artríticos transgénicos está menos afectado, con un número y una distribución de los linfocitos B relativamente normal. Sin embargo, hay un desequilibrio en el isotipo de IgG circulante, con un marcado incremento del isotipo IgG1 en los ratones NOD transgénicos en KRN. Los factores reumatoides (es decir, los anticuerpos de la región constante de los anticuerpos IgG) no se han detectado en los ratones artríticos transgénicos. Sin embargo, después de dos o tres meses, el bazo y los nódulos linfáticos de numerosos ratones NOD transgénicos en KRN, han aumentado mucho, probablemente como respuesta al estado inflamatorio constante del animal.

*Ejemplo 4**Métodos para evaluar composiciones antiartríticas*

Debido a la naturaleza fiable y reproducible de la artritis en los ratones artríticos transgénicos de la invención, y a su clara relación con la artritis reumatoide humana, los animales transgénicos de la invención se emplean para estimar la seguridad y la eficacia de las composiciones antiartríticas en desarrollo. Las composiciones antiartríticas se administran antes del comienzo de las manifestaciones clínicas, o después de que la enfermedad se haya establecido, pero antes de que tenga lugar la destrucción y la deformación irremediable de las articulaciones.

Inmunointervención terapéutica

Los ratones artríticos NOD transgénico en KRN se trataron con anticuerpo anti-CD4, una composición que ha mostrado ciertas promesas para aliviar los síntomas de la RA en seres humanos. Moreland, L. W. y col., *Arthritis Rheum.* 36:307-319 (1993). El progreso de la artritis en los animales tratados, y en los animales testigos sin tratar, se vigiló examinando clínicamente los ratones cada tercer día. Según se indica en la Figura 7, el tratamiento de los ratones artríticos transgénicos con el anticuerpo anti-CD4 a partir de las dos semanas de edad, impidió la aparición de manifestaciones patológicas.

El modelo animal de la invención se utiliza para evaluar otras composiciones antiartríticas potenciales, que incluyen pero no están limitadas a las mismas, los glucocorticoides, las linfocinas, los interferones, los conjugados de citotoxinas con anticuerpos, las proteínas del CD, las proteínas del CPH, los derivados de las proteínas del CD y del CPH, y compuestos sintéticos o biomoléculas efectoras aisladas que influyen en la presentación del antígeno a través de las moléculas del CPH, el reconocimiento del TCR de antígenos presentados por el CPH, y/o interacciones entre moléculas del CPH y proteínas del CD. Debido a que los animales artríticos transgénicos de la invención desarrollan síntomas artríticos en una manera predecible, se pueden examinar diferentes efectos de composiciones antiartríticas sometidas a ensayo en el modelo animal de la invención, de una manera más rigurosa que la que era posible previamente.

Las composiciones antiartríticas pueden conseguir su efecto, impidiendo la inflamación, limitando la respuesta inflamatoria, o limitando la destrucción de tejido que tiene lugar después de la inflamación. La administración de una composición antiartrítica a los animales transgénicos de la invención, en unos momentos definidos postnatales, revela si la composición ejerce su efecto en un estado precoz o tardío de la artritis. Por ejemplo, las composiciones antiartríticas que impiden a inflamación, no serán eficaces si se administran después de que se haya iniciado la respuesta inflamatoria, de forma similar a las composiciones antiartríticas que impiden la destrucción secuelar del tejido.

La potencia de las composiciones antiartríticas se evalúa en términos de provocar un retraso estadísticamente significativo en el momento del comienzo y/o de la extensión de la inflamación, y/o de la destrucción irremediable de la articulación y la deformación de la extremidad, en los animales artríticos transgénicos de la invención. Los cambios en los parámetros inmunológicos celulares de los animales artríticos transgénicos de la invención, p. ej., el número y la distribución de las células CD4⁺ o CD8⁺ o de las moléculas concretas de TCR o de Ig, como una respuesta a las composiciones antiartríticas, se determinan para elucidar los mecanismos subyacentes de la inmunointervención terapéutica.

Terapia genética

Los transgenes que comprenden las secuencias de ADN que codifican productos génicos potencialmente antiartríticos, que incluyen los polipéptidos, se introducen en el genoma de un ratón. Los transgenes antiartríticos candidatos se introducen en el modelo animal artrítico transgénico de la invención, mediante el apareamiento de un descendiente del animal precursor transgénico antiartrítico con ratones artríticos transgénicos tratados con anti-CD4, u otro agente

antiartrítico, impartiendo de este modo una movilidad suficiente a los ratones artríticos transgénicos, para que emprendan el proceso de apareamiento con vigor. Alternativamente, los transgenes antiartríticos candidatos se introducen en los genomas de individuos de la cepa NOD de ratones, y un descendiente del precursor NOD se aparea con un ratón transgénico en KRN no artrítico y transgénico, y se vigila y se compara el desarrollo de síntomas artríticos en descendientes que lo son de forma sencilla y por partida doble. Una secuencia de ADN antiartrítico es una que cuando se expresa en un animal artrítico transgénico que desarrolla artritis en ausencia de la secuencia de ADN antiartrítica, produce como resultado una inflamación retrasada o ausente, o limita o elimina la destrucción secuestral del tejido, después de la inflamación.

10 Ejemplo 5

Métodos de evaluar las composiciones artritogénicas

En los ratones transgénicos en KRN con un locus en el CPH procedente de la cepa NOD de ratones, todos los ratones transgénicos desarrollaron artritis. Los ratones transgénicos en KRN con un locus del CPH procedente de cepas de ratones en los cuales el alelo transgénico KRN fallaba para inducir la artritis, se emplearon para evaluar las composiciones en relación con su potencial artritogénico. Las composiciones que intensifican el potencial artrítico del alelo transgénico KRN, son artritogénicas en el modelo animal de la invención. Tales composiciones incluyen, sin estar limitadas a las mismas, los glucocorticoides, las linfocinas, los interferones, los conjugados de citotoxinas con anticuerpos, las proteínas CD, las proteínas del CPH, los derivados de las proteínas CD y del CPH, y los compuestos sintéticos o las biomoléculas efectoras aisladas que influyen en la presentación del antígeno a través de moléculas del CPH, el reconocimiento del TCR de antígenos presentados por el CPH, y/o interacciones entre las moléculas del CPH y las proteínas CD. Las biomoléculas efectoras aisladas (p. ej., interferón γ) que pueden ser más prevalentes en las hembras humanas, y que, por ello, se ha sugerido que están relacionadas con una incidencia incrementada de la RA en las mismas (Fox, H. S. y col., *J. Immunol.* 146:4362-4367 (1991)), se sometieron a ensayo en animales no humanos transgénicos, machos y hembras de la invención, para eliminar los efectos debidos a otras diferencias de género.

Las composiciones artritogénicas también incluyen los transgenes que codifican una proteína del CPH, en donde las secuencias de ADN expresadas por los transgenes se obtienen a partir de los loci del CPH de animales que incluyen a los seres humanos. Algunas proteínas del CPH influyen sobre la aparición de la enfermedad autoinmune, y se ha mostrado que alelos específicos del CPH están correlacionados con un mayor riesgo de padecer determinadas enfermedades autoinmunes humanas. En los seres humanos, en los que los antígenos del CPH se conocen como proteínas del HLA (antígenos de leucocitos humanos), por ejemplo, los individuos con el alelo HLA-DR4 tienen seis veces más probabilidad de padecer artritis reumatoide que otras variantes del HLA. Steinman, L., *Sci. American* 269:106-114 (1993). La artritis por Yersinia y la espondilitis anquilosante están muy correlacionadas con el alelo HLA-B27. Vaughan, J. H., en "Enfermedades inmunológicas", volumen II, 3ª edición, Samter, M., compilador, Little, Brown and Company, páginas 1029-1037 (1978).

Según se ha mostrado con experimentos con ratones transgénicos, el repertorio de linfocitos T de ratón es perfectamente capaz de usar los productos génicos humanos del CPH (proteínas HLA). Kievits, F. y col., *Nature* 329:447-449 (1987). Las secuencias de ADN que codifican moléculas particulares del HLA de seres humanos, se aislaron y se modificaron genéticamente de modo que fueran capaces de introducirse en el genoma del ratón y expresarse en las células de médula. El uso de los productos génicos del CPH humano en los ratones, requiere la presencia concomitante de moléculas proteicas de microglobulina β_2 ; por consiguiente, las secuencias de ADN que codifican la microglobulina β_2 humana, se modifican genéticamente de forma similar. Kievits, F. y col., *Nature* 329:447-449 (1987). Los transgenes se introducen en el genoma de un ratón, y uno de los descendientes de un precursor doblemente transgénico (CPH y microglobulina β_2) se aparea con un ratón transgénico en KRN no artrítico. Los descendientes doblemente transgénicos (CPH y microglobulina β_2) y triplemente transgénicos (CPH, microglobulina β_2 y KRN), se identificaron mediante el ensayo de hibridación descrito anteriormente, usando las sondas obtenidas a partir de las secuencias de ADN de los transgenes del CPH, microglobulina β_2 y KRN. La aparición y el desarrollo de síntomas artríticos en los descendientes triplemente transgénicos, se vigilaron y se compararon con los de los hermanos de camada doblemente transgénicos y no transgénicos.

Una secuencia de ADN artritogénica es una que cuando se expresa en un animal artrítico transgénico que no desarrolla artritis en ausencia de la secuencia de ADN artritogénica, produce una manifestación parcial o total del fenotipo KRN. Las secuencias de ADN que se pueden someter a ensayo por el método de la invención, incluyen pero no están limitadas a las mismas, las del HLA-B27, HLA-DR4 y otros genes humanos que codifican las proteínas del CPH humano (junto con transgenes que codifican microglobulina β_2 humana) (Kievits, F. y col., *Nature* 329:447-449 (1987)), y alelos del CPH procedentes de animales para los que se han buscado garantías de una movilidad prolongada (p. ej., los caballos de carreras) junto con los genes de la microglobulina β_2 apropiados para la especie del animal que aporta el alelo del CPH que se va a someter a ensayo. El modelo animal de la invención proporciona una base para determinar los mecanismos celulares y moleculares subyacentes de las correlaciones observadas entre alelos particulares del CPH y diversas formas de artritis humana. Por ejemplo, la proteína humana del CPH codificada por HLA-B27 está asociada con algunos tipos de artritis en los seres humanos (Vaughns, véase más arriba) y, cuando se expresa transgénicamente en los ratones, es capaz de presentar antígenos a los TCRs de médula (Kievits y col., véase más arriba). Este enfoque es más satisfactorio, por lo menos en el sentido mecánico, que determinando las correlaciones entre alelos particulares del CPH humano y enfermedades artríticas.

La potencia de las composiciones artríticas se evalúa en términos de provocar un avance estadísticamente significativo en el momento del comienzo de la artritis y/o el aumento del grado de inflamación y/o de la destrucción irremediable de la articulación y la deformación de la extremidad en los animales artríticos transgénicos de la invención. Alternativa o adicionalmente, la potencia de las composiciones artríticas se evalúa en términos de un incremento estadísticamente significativo en la incidencia de la artritis o de los síntomas artríticos en los animales no artríticos, transgénicos en KRN de la invención. Los cambios en parámetros inmunológicos celulares de los animales transgénicos de la invención, p. ej., el número y la distribución de las células CD4⁺ o CD8⁺ o de las moléculas concretas del TCR o de la Ig, como respuesta a las composiciones artríticas, se determinan para elucidar los mecanismos subyacentes de la inmunointervención terapéutica.

Ejemplo 6

Aislamiento de los componentes del sistema inmune que se unen a los autoantígenos endógenos polipeptídicos artríticos

Este ejemplo describe métodos para aislar antígenos polipeptídicos que son reconocidos por los TCRs codificados por el transgén en los ratones artríticos transgénicos de la invención. Estos polipéptidos se emplean para aislar células y biomoléculas efectoras de los sistemas inmunes de los animales artríticos transgénicos de la invención, que se unen específicamente a uno o a varios epítomos de las proteínas del múrido que comprenden autoantígenos artríticos polipeptídicos (PASAs). Las células y las biomoléculas efectoras aisladas se emplean para aislar proteínas que comprenden PASAs, de otras especies de animales que incluyen a los seres humanos (Ejemplo 7).

Oligopéptidos presentados por APCs en animales artríticos. Un requisito previo para los ejemplos siguientes es la identificación de los antígenos endógenos polipeptídicos que se presentan al TCR codificado por el transgén de la invención, durante la etiología de la artritis. Para este fin, las células presentadoras de antígeno (APCs) se aíslan a partir de ratones artríticos transgénicos en diferentes momentos antes y durante el desarrollo de los síntomas artríticos. Tienen un interés particular las APCs presentes en el timo durante el período activo de delección clónica, en torno al nacimiento, sin embargo, las APCs también se aíslan a partir de otros tejidos y en otros momentos durante la vida de los ratones. La sangre venosa heparinizada se obtiene a partir de ratones artríticos transgénicos de la invención, y las células sanguíneas polimorfonucleares (PMBCs) a partir de la misma, p. ej., mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque. En las preparaciones de PMBC se eliminan los monocitos y/o los macrófagos mediante adherencia a plástico, durante 2 horas a 37°C, en matraces de cultivo de tejidos. Las células adherentes se recuperan mediante raspado, se resuspenden en un medio tamponado apropiado que no incluye suero de ternera fetal (FCS), ya que el suero de ternera fetal contiene antígeno(s) que puede(n) ser reconocido(s) por el TCR de R28. Dellabona, P. y col., *Eur. J. Immunol.* 21:209-213 (1991). Las células resuspendidas se emplean como una fuente de APCs. Koulova, L. y col., *J. Immunol.* 145:2035-2043 (1990).

Las APCs se tratan con 0,025% de tripsina para potenciar la recogida de oligopéptidos. Los oligopéptidos asociados con moléculas del CPH se aíslan según el método de Slingluff, C. L. y col., *J. Immunol.* 150:2955-2963 (1993), y se fraccionan mediante cromatografía líquida de alta presión en fase inversa (HPLC), aunque se pueden emplear otras técnicas de separación. Lehninger, A. L., "Bioquímica", 2ª edición, págs. 95-121. Las fracciones de la HPLC que contenían péptidos relevantes, se identifican mediante la activación de las células del hibridoma R28, midiendo la producción de interleucina 2, en presencia de las APCs aisladas a partir de ratones NOD no artríticos. Miedema, F. y Melief, C. J. M., *Immunol. Today* 6:258-259 (1985). Las fracciones de la HPLC que contienen actividad se reúnen y se someten de nuevo a cromatografía, tal y como se requiere para generar fracciones con una pureza suficiente para los usos subsiguientes deseados. Sin embargo, incluso las fracciones relativamente en crudo, son suficientes para identificar hibridomas que producen biomoléculas efectoras específicas de los autoantígenos artríticos polipeptídicos endógenos (PASAs).

Si se genera suficiente material homogéneo, los oligopéptidos de las fracciones de la HPLC que estimulan R28, se secuencian mediante métodos convencionales, que incluyen pero no están limitados a los mismos, la degradación repetitiva de Edman. Lehninger, A. L., "Bioquímica", 2ª edición, págs. 95-121 (1978). Alternativamente, se emplea la espectrometría de masas en tándem (TMS) para identificar las secuencias de los péptidos más numerosos. Cox, A. L. y col., *Science* 264:716-719 (1994). Aunque la TMS no distingue entre los residuos de los aminoácidos Ile y Leu en un polipéptido, la TMS genera datos de la secuencia de aminoácidos que se pueden utilizar para diseñar parejas de oligopéptidos que comprenden alternativamente Ile o Leu. Los oligopéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de TMS, se sintetizan químicamente según métodos convencionales (Stewart y Young, "Síntesis de péptidos en fase sólida", Pierce Chemical Co., Rockland, Illinois. (1985)) y se purifican a partir de mezclas de la reacción mediante HPLC en fase inversa. Los oligopéptidos sintéticos aislados se someten a ensayo para estudiar su capacidad para estimular el hibridoma R28 en presencia de APCs aisladas a partir de ratones NOD no transgénicos, y de esta manera, se determinan las secuencias de los oligopéptidos estimuladores reales de R28. Estas secuencias de aminoácidos se corresponden con fragmentos cortos del polipéptido, obtenidos a partir de proteínas que comprenden PASAs endógenas.

Producción de hibridomas

El bazo y el timo se aislaron post mortem a partir de un ratón transgénico artrítico (p. ej., un ratón NOD transgénico en KRN). Los linfocitos (T o B) se prepararon a partir de los bazos o del timo aislados, de uno o de varios animales transgénicos en diferentes momentos durante el desarrollo de la artritis. Linfocitos T o B que producen anticuerpos aislados, se fusionaron *in vitro* con células inmortalizantes. Las líneas celulares fusionadas resultantes que se reproducen de forma estable (hibridomas), en donde cada una de ellas expresa TCRs (linfocitos T) o anticuerpos (linfocitos B) con regiones de unión al antígeno únicas (variables), se cultivando mediante técnicas de cultivo convencionales para linfocitos. Harlow, E. y Lane, D., "Anticuerpos: Un manual de laboratorio", Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y., páginas 139-281 (1988); Ausubel, F. M. y col., compiladores, "Protocolos actuales en biología molecular", volumen 2, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, páginas 11.4.1-11.11.5 (1993).

Los hibridomas de los linfocitos T se escrutan en busca de activación (medida como la secreción interleucina 2) con APCs preparadas a partir de ratones NOD, en presencia o ausencia de un oligopéptido correspondiente a los aminoácidos 41-61 de la ribonucleasa pancreática bovina (BPR) y que tiene la secuencia de aminoácidos

Lys-Pro-Val-Asn-Thr-Phe-Val-His-Glu-Ser-Leu-Ala-Asp-Val-Gln-Ala-Val-Cys-Ser-Gln-Lys [SEQ ID NO. 1].

Alternativamente, los hibridomas de los linfocitos T se escrutan en busca de activación en presencia del oligopéptido obtenido a partir de BPR y de APCs que muestren una molécula A^k del CPH de tipo silvestre o mutante, debido a la transfección con un gen regulable A^k del CPH. Dellabona, P. y col., *Eur. J. Immunol.* 21:209-213 (1991). Cualquier tipo de APC se emplea alternativamente con oligopéptidos en crudo o sintéticos, obtenidos a partir de proteínas que comprenden PASAs (véase más arriba). En cualquier caso, las células del hibridoma R28 se utilizan como testigos positivos. Los hibridomas de linfocitos T identificados y aislados de esta manera, expresan las subunidades de TCR que son idénticas a las codificadas por los transgenes de la invención, o a sus mutantes producidos en los ratones artríticos transgénicos y que tienen las características de la unión alteradas.

Los hibridomas de linfocitos B se escrutan en busca de la producción de un anticuerpo monoclonal que reconozca el oligopéptido obtenido a partir de BPR y/o los oligopéptidos en crudo o sintéticos obtenidos a partir de las proteínas que comprenden PASAs (véase más arriba). Los hibridomas de linfocitos B deseados se identifican a través de ensayos ELISA, usando el oligopéptido obtenido a partir de BPR y/o los oligopéptidos en crudo o sintéticos obtenidos a partir de las proteínas que comprenden PASAs como antígeno. Los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas identificados se purifican si es necesario. Harlow, E. y Lane, D., "Anticuerpos: Un manual de laboratorio", Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y., páginas 139-281 (1988); Ausubel, F. M. y col., compiladores, "Protocolos actuales en biología molecular", volumen 2, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, páginas 11.4.1-11.11.5 (1993).

Anticuerpos monoespecíficos

Los oligopéptidos en crudo o sintéticos obtenidos a partir de proteínas que comprenden PASAs endógenas (véase más arriba), se emplean para generar anticuerpos monoespecíficos que se emplean en los siguientes ejemplos.

Un "anticuerpo policlonal" se refiere a una composición que comprende un surtido de diferentes anticuerpos, reconociendo todos un antígeno en particular. Aunque son útiles en una variedad de maneras, los anticuerpos policlonales tienen limitaciones debidas a su composición heteróloga. Por ejemplo, generalmente se observan unas reactividades cruzadas de algunos anticuerpos policlonales con los antígenos que son diferentes al que se está utilizando para inducir una respuesta inmune. La especificidad de un anticuerpo policlonal se puede limitar a un epítipo concreto usando un antígeno o un hapteno aislado o sintético correspondiente a un único epítipo elegido. El antígeno, o el hapteno asociado con un vehículo, se emplea para generar una respuesta inmune humoral en un animal. El anticuerpo policlonal que se obtiene como resultado, es específico del epítipo elegido y se designa un "anticuerpo monoespecífico" o "anticuerpo anti-peptídico". Particularmente, los oligopéptidos sintéticos se emplean como antígenos o haptenos para generar anticuerpos monoespecíficos que se pueden utilizar para analizar o aislar una proteína que comprende una secuencia que se corresponde o es similar a la secuencia del oligopéptido.

Los oligopéptidos en crudo o sintéticos obtenidos a partir de proteína que comprenden PASAs endógenas (véase más arriba), se emplean para generar anticuerpos monoespecíficos según métodos convencionales. Wilkins, T. D. y col., patente de EE.UU. número 4.879.218 (7 de noviembre de 1989); Harlow, E. y Lane, D., "Anticuerpos: Un manual de laboratorio", Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y., páginas 53-137 (1988); Ausubel, F. M. y col., compiladores, "Protocolos actuales en biología molecular", volumen 2, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, páginas 11.12.1-11.15.4 (1993).

Ejemplo 7

Aislamiento de proteínas que comprenden autoantígenos artríticos polipeptídicos (PASAs)

5 Durante el desarrollo de los ratones artríticos transgénicos de la invención, un evento inmunológico iniciador dispara una cascada de eventos inmunológicos que culmina con que los animales transgénicos desarrollan síntomas graves artríticos en una manera reproducible y, por tanto, predecible. Debido a que el alelo transgénico KRN aparece en una mayoría de los linfocitos T en un ratón individual que tiene un TCR específico, y debido a que las proteínas del CPH que presentan antígenos procedentes de cepas de ratones particulares, son necesarias para que se manifieste el fenotipo transgénico, es posible que un evento inmunológico importante que ocurre relativamente pronto en la artritis sea el reconocimiento de los autoantígenos endógenos a través de los linfocitos T. Estos autoantígenos endógenos se denominan generalmente en esta memoria, autoantígenos artríticos polipeptídicos endógenos (PASAs). La proteína de murino que comprende estos PASAs, se cree que se corresponde con una proteína humana de una importancia primordial en la génesis de la RA humana. Las proteínas humanas que comprenden PASAs y los compuestos sintéticos y derivatizados obtenidos a partir de proteínas humanas que comprenden PASAs, son útiles en el diagnóstico, la prevención o la terapia de la artritis en seres humanos (véanse los ejemplos siguientes). Los animales artríticos transgénicos de la presente invención proporcionan los medios con los cuales las proteínas que comprenden PASAs, o las secuencias de ADN que codifican tales proteínas, se pueden aislar a partir de muchas fuentes animales incluyendo los seres humanos.

Purificación de proteínas que comprenden PASAs mediante inmunodetección

25 Los anticuerpos monoclonales o monoespecíficos del ejemplo anterior se emplean como sondas en técnicas inmunohistológicas conocidas, para identificar la distribución física de las proteínas que comprenden PASAs en ratones normales y artríticos, y en animales más grandes (p. ej., ovejas, perros, vacas, caballos, etc.), a partir de los cuales se puede obtener más fácilmente, material suficiente para la purificación de las proteínas, según métodos convencionales. En caso de necesidad, se examinan los animales en diferentes etapas del desarrollo. Ausubel, F. M. y col., compiladores, "Protocolos actuales en biología molecular", volumen 2, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, páginas 14.0.1-14.6.13 (1993).

35 Los tejidos que tienen concentraciones relativamente altas de proteínas que comprenden PASAs, se retiran de los animales post mortem y se utilizan como una fuente de proteínas que comprenden PASAs para purificarlas. Como ensayo de purificación, se puede emplear la activación de células R28, descrita en un ejemplo anterior. Se emplean métodos convencionales para la purificación de proteínas. Lehninger, A. L., "Bioquímica", 2ª edición, págs. 95-121. Además o alternativamente, se emplean columnas de afinidad que como agentes de unión que comprenden los anticuerpos monoclonales o monoespecíficos del ejemplo anterior. Harlow, E. y Lane, D., "Anticuerpos: Un manual de laboratorio", Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y., páginas 511-552 (1988). Las proteínas que comprenden PASAs purificadas se secuencian por métodos convencionales, que incluyen pero no están limitados a la proteólisis parcial y la degradación repetitiva de Edman. Lehninger, A. L., "Bioquímica", 2ª edición, págs. 95-121 (1978).

Secuencias de ADN que codifican las proteínas que comprenden PASAs

45 La secuencia de aminoácidos de oligopéptidos obtenidos a partir de PASAs unidos a APCs, o de proteínas que comprenden PASAs, o de ambas, se utiliza junto con el código genético (Tabla 2) para diseñar las secuencias de ADN correspondientes para la construcción de oligonucleótidos sintéticos capaces de hibridarse específicamente con genes que codifican proteínas que comprenden PASAs. Lathe, R., *J. Mol. Biol.* 183:1-12 (1985). Los oligonucleótidos se emplean como sondas para detectar los fragmentos de restricción de ADN que codifican las secuencias de aminoácidos de la proteína que comprende PASAs; los fragmentos de restricción se clonan a continuación en vectores apropiados. Ruter, W. J. y col., documento de patente de EE.UU. número 4.440.859 (3 de abril de 1984). Alternativamente, los oligonucleótidos se emplean como cebadores en reacciones PCR para amplificar las secuencias de ADN que codifican proteínas que comprenden PASAs. Mullis, K. B. y col., documento de patente de EE.UU. número 4.965.188 (23 de octubre de 1990). Particularmente, la PCR inversa se emplea para generar la máxima cantidad de información sobre la secuencia que codifica la proteína que comprende PASAs a partir de la menor cantidad de información sobre la secuencia de aminoácidos. Ochman, H. y col., en "Tecnología de la PCR: Principios y aplicaciones para la amplificación del ADN", Erlich, H. A., compilador, Stockton Press, Londres, páginas 105-111 (1989). Los productos de la PCR se clonan a continuación en vectores apropiados y se secuencian o se secuencian directamente. Gyllenstein, U., en "Tecnología de la PCR: Principios y aplicaciones para la amplificación del ADN", Erlich, H. A., compilador, Stockton Press, Londres, páginas 45-60 (1989). Para producir las proteínas que comprenden PASAs, las secuencias de ADN que codifican las proteínas, se clonaron en los vectores de expresión apropiados, los cuales se introdujeron a continuación en sus células hospedadoras conocidas, en donde tenía lugar la biosíntesis dirigida de las proteínas que comprenden PASAs. Rutter, W. J. y col., documento de patente de EE.UU. número 4.440.859 (3 de abril de 1984).

Ejemplo 8

Composiciones terapéuticas

- 5 Las proteínas que comprenden PASAs del ejemplo anterior, y las regiones variables de las subunidades del TCR del transgén de la invención, se emplean para generar diversas composiciones útiles para el tratamiento de animales artríticos que incluyen a los seres humanos.

Inmunización con oligopéptidos de TCR

- 10 Aunque el mecanismo permanece confuso, la inmunización con oligopéptidos sintéticos correspondientes a las regiones variables de las subunidades de TCR ha mostrado que evita o invierte la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE). La EAE se induce mediante la autoinmunización de animales con MBP y produce los síntomas clínicos de la MS, es decir, desmielinación y parálisis. Howell, W. M. y col., *Science* 264:668-670 (1989); Vanderbark y col.,
 15 *Nature* 341:541-544 (1989). Un ensayo piloto del tratamiento de los seres humanos que padecen MS con oligopéptidos obtenidos a partir de TCR está en curso actualmente. Oksenberg, J. R. y col., *J. Neurol. Sci.* 115 (supl.):S29-S37 (1993).

- Aunque las secuencias de aminoácidos de la región variable del TCR de la invención, se han aislado a partir de un hibridoma de múrido, la relación notable de los TCRs implicados en enfermedades autoinmunes atraviesa líneas de especies, sugiriendo que los componentes moleculares del sistema inmune están lo suficientemente conservados para permitir que composiciones terapéuticas humanas se obtengan a partir de moléculas de TCRs de múrido. Por ejemplo, algunos pacientes con MS tienen poblaciones de TCRs que están hiper-representadas con TCRs que reconocen un fragmento de la proteína básica de la mielina (MBP), unida a una parte del receptor de HLA (la molécula HLA-DR2). Una secuencia de tres aminoácidos, requerida al parecer para reconocer el complejo MBP:HLA-DR2, estaba presente
 25 en estos TCRs. Oksenberg, J. R. y col., *Nature* 362:68-70 (1993). El mismo fragmento de MBP es reconocido por una clase predominante de TCRs en un modelo animal de MS, EAE. Los TCRs que son predominantes en animales con EAE, tienen la misma secuencia de tres aminoácidos, encontrada en los TCRs de seres humanos con MS. Gold, D. P. y col., *J. Exp. Med.* 174:1467-1476 (1991); Hashim, G. y col., *J. Immunol.* 146:515-520 (1991); Offner, H. y col., *J. Immunol.* 146:4165-4172 (1991); Vainiene, M. y col., *J. Neurosci. Res.* 31:413-420 (1992); Offner, H. y col., *J. Immunol.* 148:1706-1711 (1992); Gold, D. P. y col., *J. Immunol.* 148:1712-1717 (1992); Offner, H. y col., *J. Immunol.* 151:506-517 (1993).
 30

- Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las subunidades de TCRs, obtenidas a partir de R28 [SEQ ID No. 5 y 7], se emplean para diseñar oligopéptidos sintéticos que tienen un valor terapéutico en los animales que no son múridos, incluyendo los seres humanos. Los oligopéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos
 35 obtenidas a partir de SEQ ID No. 5 y 7, se sintetizan químicamente según métodos convencionales (Stewart y Young, "Síntesis de péptidos en fase sólida", Pierce Chemical Co., Rockland, Illinois. (1985)) y se purifican a partir de mezclas de reacción mediante HPLC de fase inversa. Los oligopéptidos antiartríticos más eficaces se identifican mediante los ensayos descritos en el Ejemplo 4.

Terapia oral para la tolerancia

- Aunque la autoinmunización puede ser el resultado de la presentación directa de un auto-antígeno a un animal, p. ej., mediante inyección subcutánea, la tolerancia se puede conseguir presentando los antígenos a un animal mediante ingestión oral. Este procedimiento, denominado terapia oral para la tolerancia, parece que activa los linfocitos T que secretan citocinas que contrarrestan algunos de los efectos de la respuesta autoinmune. Strobel, S. y col., *Immunology* 56:577-564 (1985); Mowat, A. M., *Immunology* 56:253-260 (1985); Mowat, A. M. y col., *Adv. Exp. Med. Biol.* 216A:709-720 (1987); Lamont, A. G. y col., *Immunology* 63:737-739 (1988); Mowat, A. M. y col., *Immunology* 64:141-145 (1988). Un antígeno presentado mediante la ingestión oral que produce una tolerancia incrementada hacia el antígeno se denomina tolerógeno. Thompson, H. S. y col., *Clin. Exp. Immunol.* 72:20-25 (1988); Thompson, H. S. G. y Staines, N. A., *Clin. Exp. Immunol.* 64:581-586 (1985); Thompson, H. S. y Staines, N. A., *Immunol. Today* 11:396-399 (1991).
 50

- La terapia oral para la tolerancia hacia una enfermedad autoinmune, se mostró en primer lugar alimentado animales con EAE, con la proteína básica de la mielina. Bitar, D. M. y Whitacre, C. C., *Cell Immunol.* 112:364-370 (1988); Fuller, K. A. y col., *J. Neuroimmunol.* 28:15-26 (1990); Whitacre, C. C. y col., *J. Immunol.* 147:2155-2163 (1991). La terapia oral para la tolerancia ha mostrado ser eficaz en la supresión de la artritis en modelos animales, particularmente la artritis inducida con colágeno (CIA). Thompson, H. S. y Staines, N. A., *Clin. Exp. Immunol.* 64:581-586 (1986); Nagler-Anderson, C. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83:7443-7446 (1986). Los oligopéptidos sintéticos, obtenidos a partir de la secuencia de aminoácidos del colágeno de tipo II, también son eficaces como tolerógenos. Myers, L. K. y col., *J. Exp. Med.* 170:1999-2010 (1989). Los tolerógenos polipeptídicos sintéticos también se pueden manipular para definir adicionalmente el(los) epítipo(s) requerido(s) para la tolerogenicidad. Meyers, L. K. y col., *J. Immunol.* 149:1439-1443 (1992); Meyers, L. K. y col., *J. Immunol.* 150:4652-4658 (1993); Myers, L. K. y col., *J. Immunol.* 151:500-505 (1993).
 60

- 65 Las secuencias de aminoácidos de los oligopéptidos unidos a APCs en los ratones artríticos transgénicos de la invención, o de proteínas que comprenden PASAs, se utilizan para diseñar secuencias de oligopéptidos sintéticos para la terapia oral de la tolerancia. Para la terapia humana, se emplean preferentemente secuencias de aminoácidos

procedentes de las proteínas que comprenden PASAs. Los oligopéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos elegidas, se sintetizan químicamente según métodos convencionales (Stewart y Young, “*Síntesis de péptidos en fase sólida*”, Pierce Chemical Co., Rockland, Illinois (1985)) y se purifican de la mezclas de reacción mediante HPLC en fase inversa. Los oligopéptidos anti-artríticos más eficaces se identifican mediante los ensayos descritos en el Ejemplo 4, usando la ingestión oral como medio para administrar los oligopéptidos a los animales artríticos.

Antagonistas del CPH

En la EAE, la competición *in vivo* entre el “auto”-antígeno introducido de forma artificial y los oligopéptidos sintéticos obtenidos a partir del mismo, se puede emplear para modular la inducción de respuestas autoinmunes. Estos antagonistas del CPH se unen al parecer a moléculas del CPH de APCs, y se presentan a los linfocitos T pero, debido a cambios químicos del antígeno original, no estimulan suficientemente los linfocitos T como para activarlos. Zamvil, S. S. y Steinman, L., *Annu. Rev. Immunol.* 8:579-621 (1990); Steinman, L., *Adv. Immunol.* 49:357-379. La activación de los linfocitos T responsables de los eventos inmunológicos siguientes que culminan en la artritis, se retrasa o se inhibe, con un efecto paralelo sobre el curso de la enfermedad.

Las secuencias de aminoácidos de oligopéptidos unidos a APCs en los ratones artríticos transgénicos de la invención, o a proteínas que comprenden PASAs, se emplean para el diseño de secuencias de oligopéptidos sintéticos que sirven como antagonistas del CPH. Para la terapia humana, se emplean preferentemente secuencias de aminoácidos de las proteínas que comprenden PASAs. Los oligopéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos elegidas, se sintetizan químicamente según métodos convencionales (Stewart y Young, “*Síntesis de péptidos en fase sólida*”, Pierce Chemical Co., Rockland, (1985)) y se purifican de las mezclas de reacción, mediante HPLC en fase inversa. Los oligopéptidos antiartríticos más eficaces se identifican a través de los ensayos descritos en el Ejemplo 4.

Utilidad de la invención

Las realizaciones de la invención descritas anteriormente se pueden utilizar para fines tales como los enumerados más abajo, solas o combinadas entre sí o con otros métodos y/o composiciones complementarios.

(1) Las composiciones potencialmente terapéuticas antiartríticas se evalúan para estudiar su eficacia, determinando el efecto de las composiciones sobre el progreso temporal y/o histológico de la artritis en ratones artríticos transgénicos. Las composiciones potencialmente terapéuticas antiartríticas que se evalúan incluyen, sin estar limitadas a las mismas, compuestos químicos, tolerógenos, agentes anti-inflamatorios, agentes para la terapia genética y microorganismos o células modificados genéticamente. Véase el Ejemplo 4 para los detalles.

(2) Las composiciones potencialmente artritogénicas (que inducen la artritis), se evalúan en función de su riesgo, determinando el efecto de las composiciones sobre el progreso temporal y/o histológico de la artritis en los ratones artríticos transgénicos, o determinando su capacidad para potenciar la penetrancia del alelo transgénico KRN en ratones transgénicos KRN no artríticos. Las composiciones artritogénicas potenciales que se evalúan incluyen, sin estar limitadas a las mismas, compuestos químicos, tolerógenos, agentes anti-inflamatorios, agentes para la terapia genética y microorganismos o células modificados genéticamente. Véase el Ejemplo 5 para los detalles.

(3) Los linfocitos B o T procedentes de ratones transgénicos artríticos, se aíslan y se fusionan con células inmortalizantes, para generar hibridomas de linfocitos B que producen anticuerpos monoclonales que reconocen un autoantígeno artritogénico polipeptídico endógeno (PASA), o hibridomas de linfocitos T que se activan mediante su presentación a proteínas que comprenden PASAs. Los anticuerpos monoclonales de hibridomas se emplean (a) para evaluar animales aislados que incluyen a los seres humanos en función de su riesgo para desarrollar artritis reumatoide y/o (b) para aislar proteínas que comprenden PASAs a partir de animales que incluyen a los seres humanos. Véase el Ejemplo 6 para los detalles.

(4) Las células presentadoras de antígenos (APCs) procedentes de ratones artríticos transgénicos se preparan en masa y se aíslan los antígenos polipeptídicos asociados con las mismas. Debido al repertorio limitado de TCRs en los ratones artríticos transgénicos, la mayoría de los linfocitos T se dirigen contra autoantígenos artritogénicos polipeptídicos endógenos. Los anticuerpos monoclonales o mono-específicos que reconocen los antígenos asociados a APCs, se preparan y se emplean para aislar las proteínas que comprenden PASAs de los animales que incluyen a seres humanos. Adicional o alternativamente, las secuencias de aminoácidos de los péptidos asociados a APCs, se determinan y se emplean para diseñar sondas y/o cebadores de oligonucleótidos que se emplean para aislar genes que codifican proteínas que comprenden PASAs, las cuales se emplean para producir proteínas que comprenden PASAs mediante la tecnología del ADN recombinante. Véanse los Ejemplos 6 y 7 para los detalles.

(5) Las composiciones, particularmente oligopéptidos sintéticos, útiles en la terapia antiartrítica, que incluyen la terapia oral para la tolerancia, en animales que incluyen a los seres humanos, se pueden obtener a partir de secuencias de aminoácidos (a) de proteínas que comprenden PASAs aisladas de la invención o de (b) las regiones variables de las subunidades del TCR de la invención [SEQ ID No. 5 y 7]. Véase el Ejemplo 8 para los detalles.

REIVINDICACIONES

1. Un ratón artrítico transgénico cuyas células de la línea somática y germinal contienen un transgén que codifica un receptor de linfocitos T (TCR), en donde dicho TCR tiene una subunidad alfa que comprende una región variable que tiene una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO: 5 y una subunidad beta que comprende una región variable que tiene una secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en SEQ ID NO: 7, en donde la expresión de dicho transgén produce como resultado en dicho ratón que tenga inflamación crónica y deformación de una o de varias articulaciones sinoviales, y en donde dicho transgén no es endógeno.
2. El ratón transgénico según la reivindicación 1, en donde dicho transgén dirige la expresión de las subunidades alfa y beta del receptor de los linfocitos T, que se combinan para formar dicho TCR que reconoce
 - (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos
Lys-Pro-Val-Asn-Thr-Phe-Val-His-Glu-Ser-Leu-Ala-Asp-Val-Gln-Ala-Val-Cys-Ser-Gln-Lys [SEQ ID NO. 1];
 - (b) una proteína que comprende uno o varios autoantígenos artríticos polipeptídicos endógenos; o
 - (c) ambos, el polipéptido de (a) y la proteína de (b).
3. El ratón según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho TCR comprende un primer transgén que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 y un segundo transgén que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 6.
4. Un método para producir un ratón transgénico que tiene un fenotipo de inflamación crónica y de deformación de una o varias de las articulaciones sinoviales, que comprende introducir en un ratón un vector vírico que comprende una primera secuencia de ADN seleccionada a partir de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 y una segunda secuencia de ADN seleccionada a partir de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 6.
5. El ratón según la reivindicación 3 o el método según la reivindicación 4, en donde dicho ratón comprende adicionalmente un locus del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) que codifica una molécula del CPH que muestra uno o varios autoantígenos artríticos polipeptídicos endógenos.
6. El ratón o el método según la reivindicación 5, en donde dicho locus del CPH es el locus del complejo principal de histocompatibilidad procedente de una cepa NOD de ratones.
7. Un método para producir un ratón que tiene un fenotipo de inflamación crónica y de deformación de una o de varias articulaciones sinoviales, que comprende la transferencia de linfocitos a partir del ratón tal y como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-6.
8. Un método *in vitro* para determinar si un animal, que incluye el ser humano, posee un riesgo acrecentado de desarrollar artritis reumatoide, que comprende someter a un inmunoensayo un fluido biológico procedente de dicho animal, con un anticuerpo monoclonal producible por una célula de hibridoma; en donde dicha célula de hibridoma es producible por la fusión de una célula inmortalizante con una célula productora de anticuerpos, aislada a partir del ratón transgénico artrítico tal y como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-6, en donde dicha célula productora de anticuerpo y dicha célula de hibridoma producen un anticuerpo que reconoce una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
9. Un método *in vitro* para determinar si un animal individual, incluyendo a los seres humanos, posee un riesgo acrecentado de desarrollar artritis reumatoide, que comprende someter a ensayo linfocitos T aislados procedentes de dicho animal para estudiar la reactividad de los linfocitos T frente a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
10. Un método para determinar el potencial anti-artrítico o el potencial artrítico de una composición que comprende:
 - (a) administrar una dosis conocida de dicha composición a un primer ratón transgénico tal y como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-6, antes de que tenga lugar una inflamación, una destrucción irremediable de las articulaciones y una deformación de las extremidades;
 - (b) detectar el inicio y/o vigilar el grado de destrucción irremediable de las articulaciones y la deformación de las extremidades en dicho primer ratón transgénico; y
 - (c) comparar el momento del inicio y/o el grado de destrucción irremediable de las articulaciones y la deformación de las extremidades en dicho primer ratón transgénico, con el momento del inicio y/o el grado de destrucción

irremediable de las articulaciones y de deformación de las extremidades en un segundo ratón transgénico, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-6, que no se ha expuesto a dicha composición,

en donde un retraso estadísticamente significativo del momento del inicio y/o una disminución estadísticamente significativa del grado de destrucción irremediable de las articulaciones y la deformación de las extremidades en dicho primer ratón transgénico, en relación con el momento del inicio y/o el grado de destrucción irremediable de las articulaciones y la deformación de las extremidades en dicho segundo ratón artrítico transgénico, indica el potencial antiartrítico o artritogénico de dicha composición.

11. El método según la reivindicación 10, en donde dicha composición comprende un compuesto químico que se administra mediante inyección en la circulación o mediante ingestión oral.

12. El método según la reivindicación 10, en el que dicha composición comprende un polipéptido administrado mediante inyección en la circulación de una bacteria o un virus aislado o recombinante que está vivo o atenuado, en donde dicho polipéptido está presente en la superficie de dicha bacteria o virus antes de la inyección.

13. El método según la reivindicación 10, en el que dicha composición comprende un polipéptido administrado mediante una inyección en la circulación de una bacteria o un virus aislado o recombinante, capaz de reproducirse dentro de un ratón, y dicho polipéptido se produce dentro de un ratón mediante expresión genética de una secuencia de ADN que codifica dicho polipéptido.

14. El método según la reivindicación 10, en el que dicha composición se selecciona a partir del grupo consistente en una composición probablemente anti-inflamatoria, una composición activamente anti-inflamatoria y una composición que no tiene ningún efecto sobre la inflamación por sí misma, pero que limita la destrucción del tejido resultante de los eventos inflamatorios.

15. El método según la reivindicación 10, en el que dicho primer ratón transgénico es un ratón NOD transgénico y dicho segundo ratón transgénico es un ratón NOD transgénico.

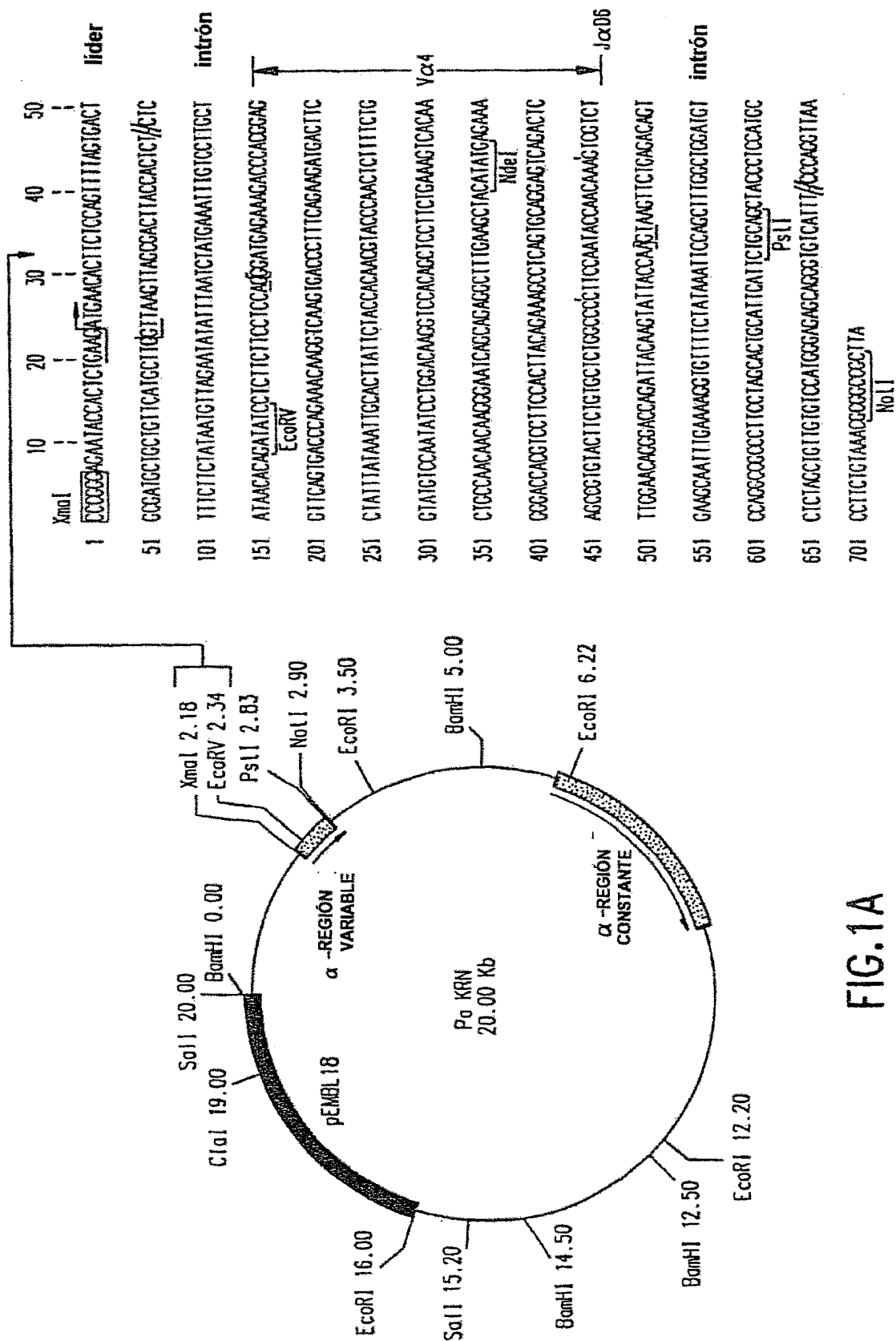


FIG.1A

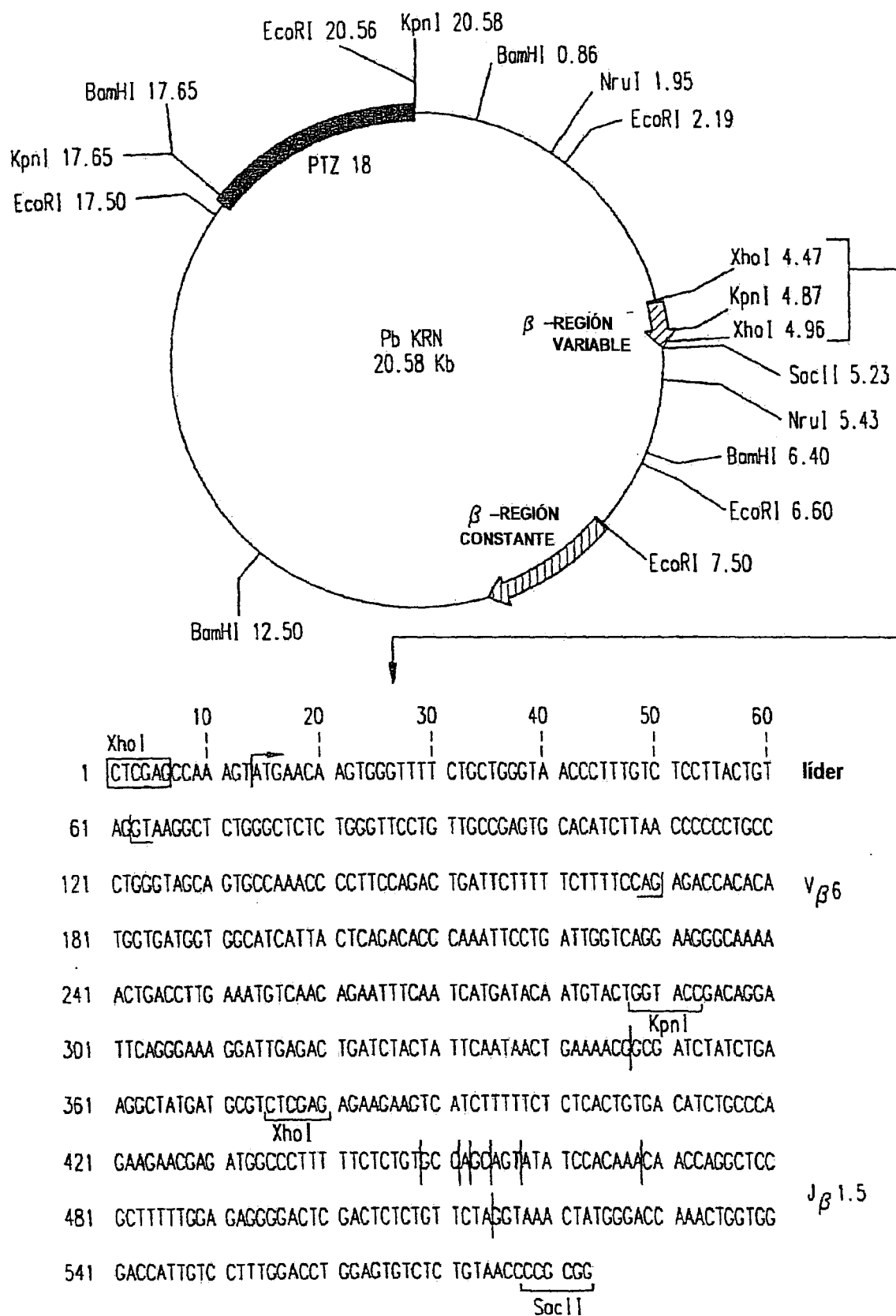


FIG.1B

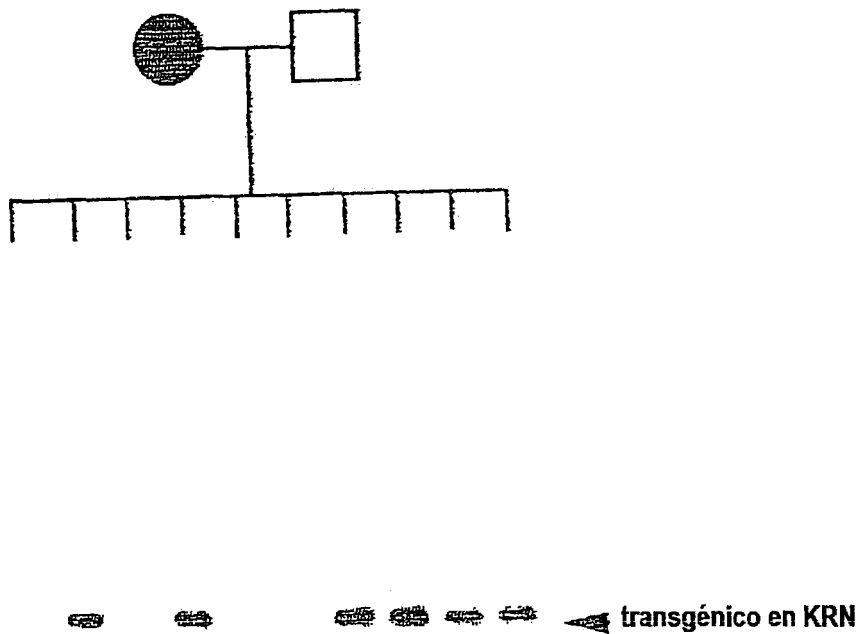


FIG.2

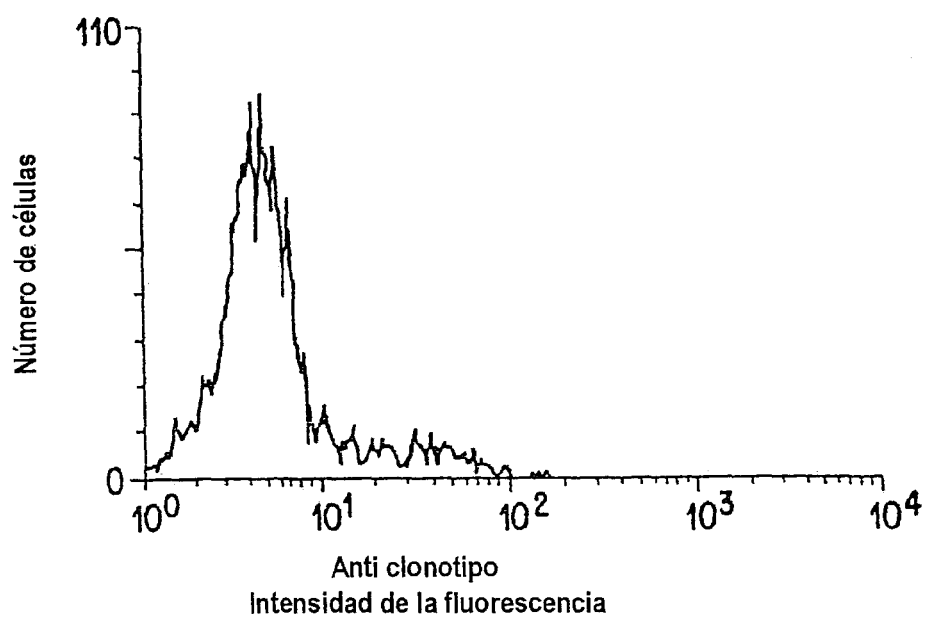


FIG. 3A

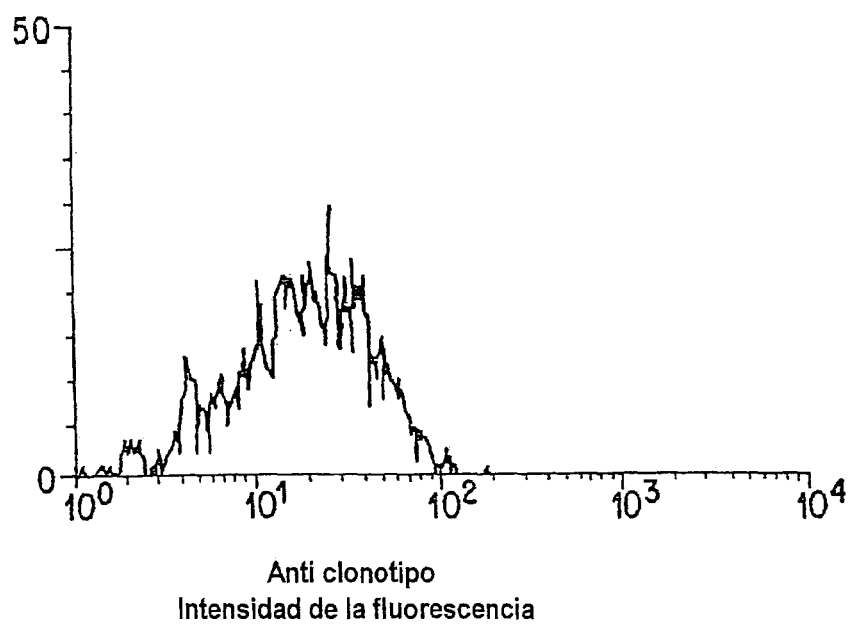


FIG. 3B

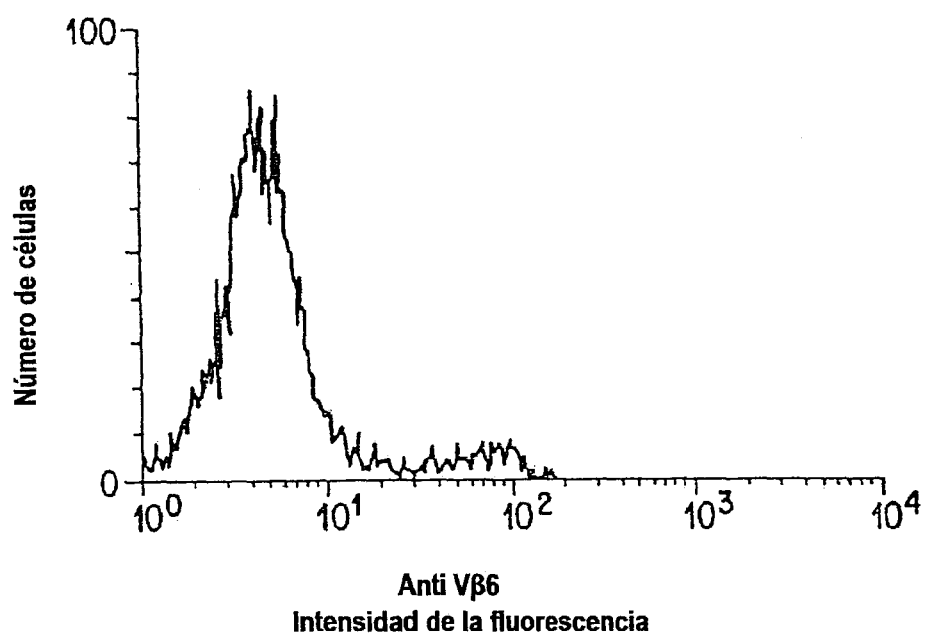


FIG. 3C

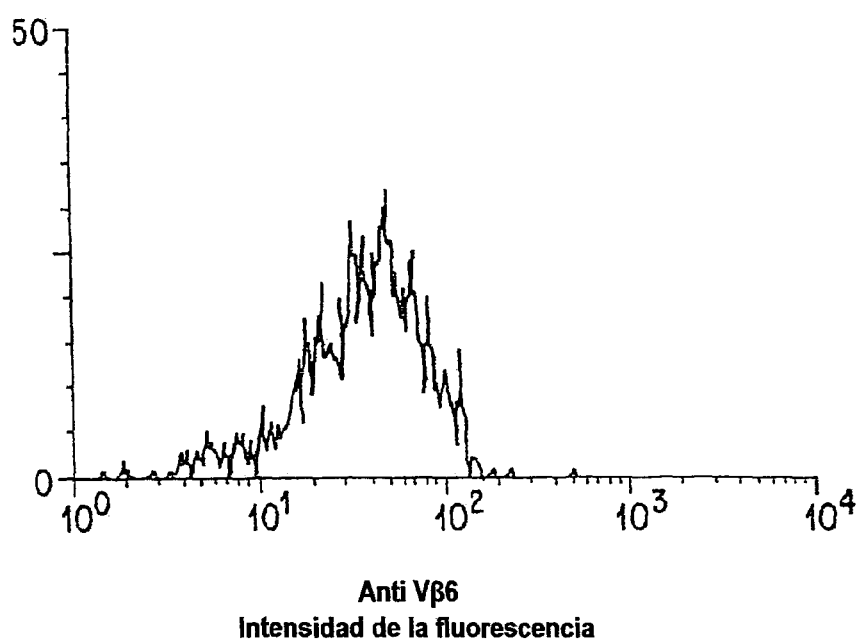


FIG. 3D



FIG.4A

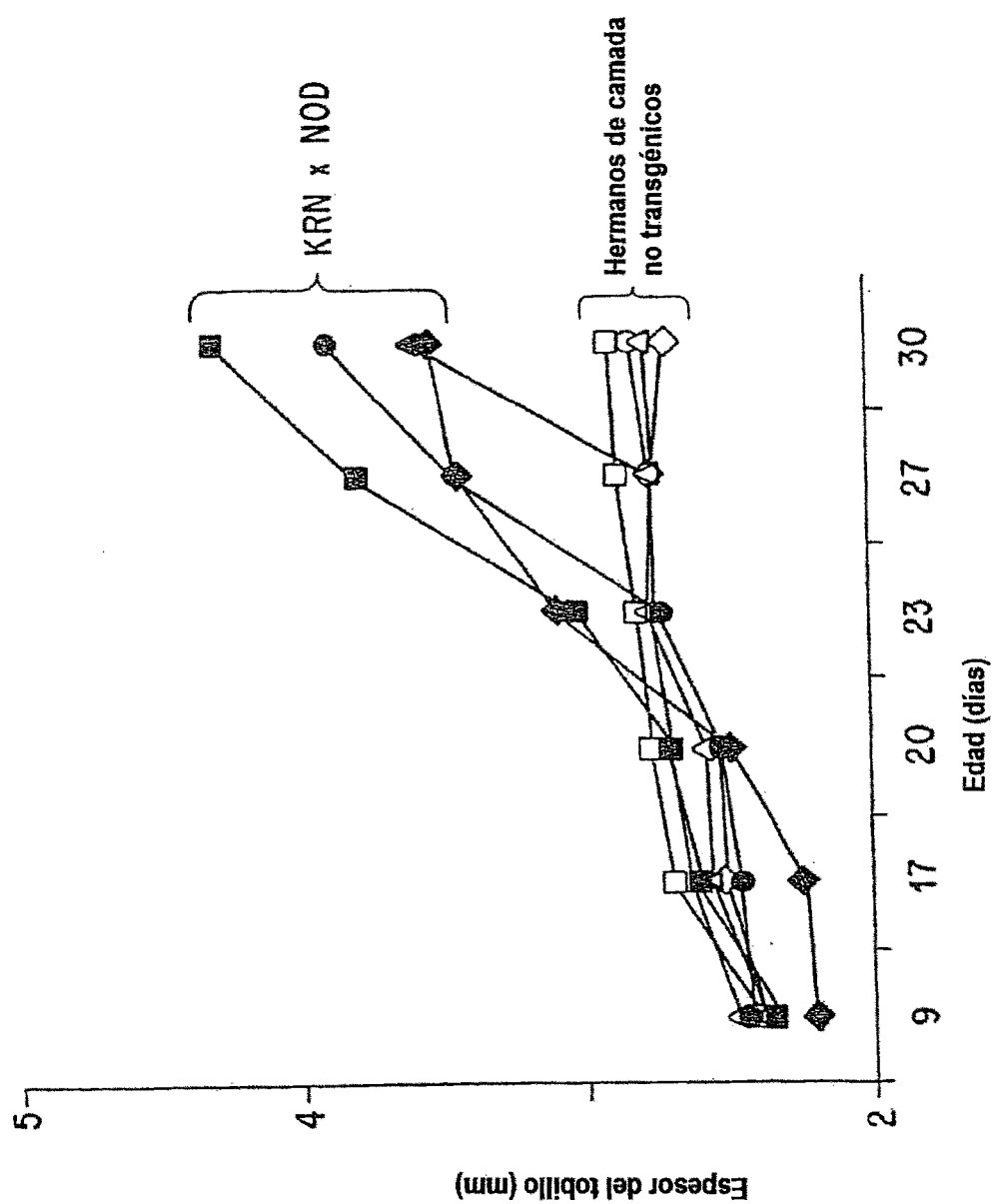


FIG. 4B

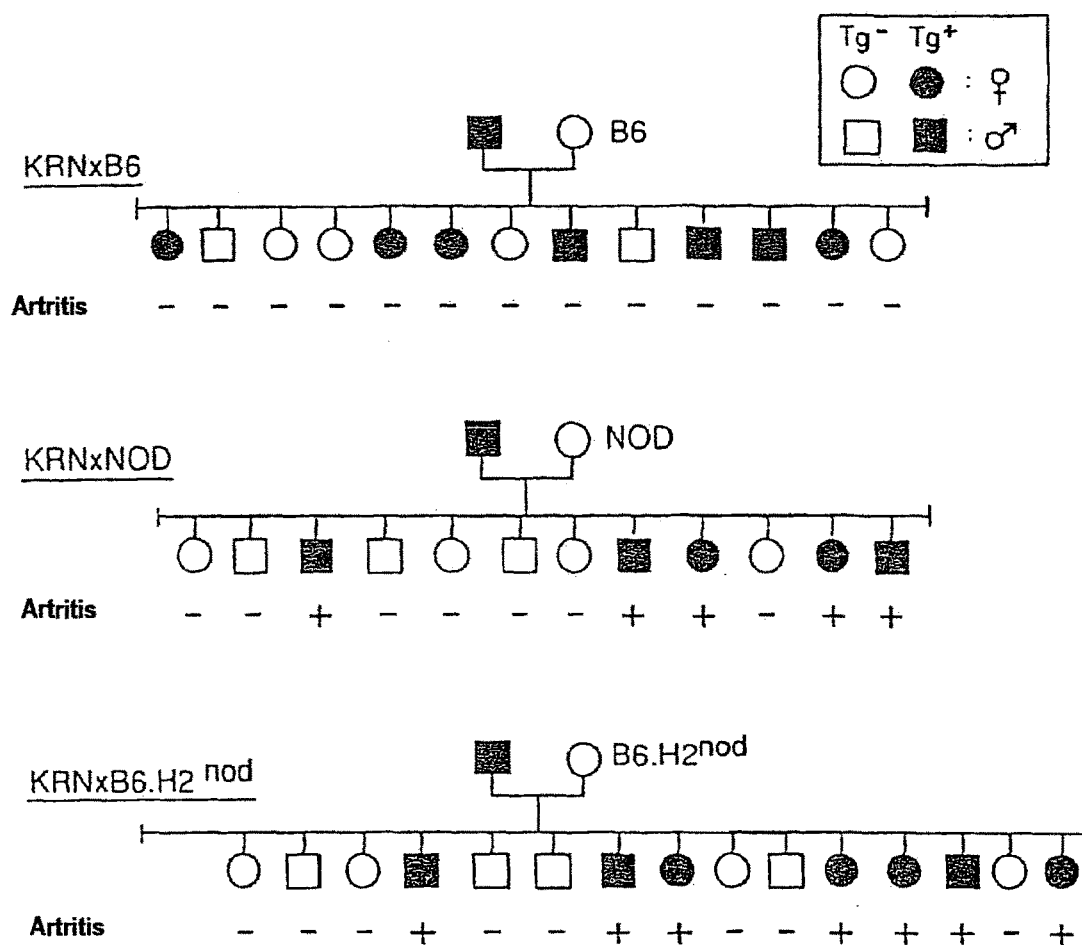


FIG. 5

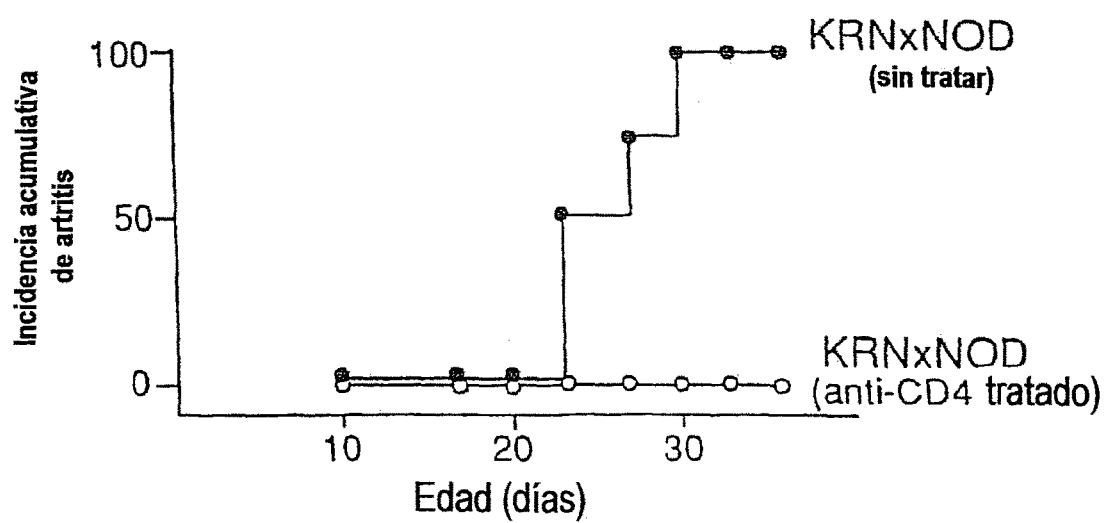


FIG. 7



FIG. 6A



FIG. 6B

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
Centre National de la Recherche Scientifique
Université Louis Pasteur, Strasbourg 1
E. R Squibb & Sons, Inc.
- 10 (ii) INVENTORES: Benoist, C.
Mathis, D.
Kouskoff, V.
- (iii) TÍTULO DE LA INVENCION: Ratones transgénicos artríticos
- 15 (iv) NÚMERO DE SECUENCIAS: 9
- (v) DIRECCIÓN DE LA CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: Sterne, Kessler, Goldstein & Fox
- 20 (B) CALLE: 1100 New York Avenue, Suite 600
- (C) CIUDAD: Washington
- (D) ESTADO: D.C.
- 25 (E) PAÍS: EE.UU.
- (F) C.P.: 20005
- (vi) FORMA LEGIBLE EN ORDENADOR:
- 30 (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
- (B) ORDENADOR: Compatible con PC IBM
- (C) SISTEMA OPERADOR: PC-DOS/MS-DOS
- 35 (D) PROGRAMA: PatentIn Release nº 1.0, Versión nº 1.25
- (vii) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: pendiente de concesión
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 18-MAYO-1995
- 40 (C) CLASIFICACIÓN:
- (viii) DATOS DE LA SOLICITUD PRIORITARIA:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 08/246.242
- 45 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 19-MAYO-1994
- (C) CLASIFICACIÓN:
- (ix) INFORMACIÓN SOBRE EL APODERADO/AGENTE:
- 50 (A) NOMBRE: Goldstein, Jorge A.
- (B) NÚMERO DE INSCRIPCIÓN: 29.021
- (C) REFERENCIA/NÚMERO DE ORDEN: 1383.008PC00
- 55 (x) INFORMACIÓN SOBRE TELECOMUNICACIONES:
- (A) TELÉFONO: (202) 371-2600
- (B) TELEFAX: (202) 371-2540

60 (2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 21 aminoácidos
- 65 (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

ES 2 321 036 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:1:

```

5      Lys Pro Val Asn Thr Phe Val His Glu Ser Leu Ala Asp Val Gln Ala
      1          5          10          15
      Val Cys Ser Gln Lys
          20

```

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 721 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

```

25      CCCGGGAGAA TACCACTCTG AAGATGAACA CTTCTCCAGT TTTAGTGA CT GCGATGCTGC      60
      TGTTCATGCT TGGTTAAGTT AGCGACTTAC CACTCTCTCT TTCTTCTATA ATGTTAGAAT      120
      ATATTTAATC TATGAAATTT GTCCTTGCTA TAACACAGAT ATCCTCTTCT TCCTCCAGGG      180
      ATGAGAAAGA CCCACGGAGG TTCAGTGACC CAGAAACAAG GTCAAGTGAC CCTTTCAGAA      240
30      GATGACTTCC TATTTATAAA TTGCACTTAT TCTACCACAA CGTACCCAAC TCTTTTCTGG      300
      TATGTCCAAT ATCCTGGACA AGGTCCACAG CTCCTTCTGA AAGTCACAAC TGCCAACAAC      360
      AAGGGAATCA GCAGAGGCTT TGAAGCTACA TATGAGAAAG GGACCACGTC CTTCCACTTA      420
35      CAGAAAGCCT CAGTGCAGGA GTCAGACTCA GCCGTGTACT TCTGTGCTCT GGCCCCCTTC      480
      AATACCAACA AAGTCGTCTT TGGAAACAGGG ACCAGATTAC AAGTATTACC AAGTAAGTTC      540
      TGAGACAGTG AAGCAATTG AAAAGGTGTT TTCTATAAAT TCCAGCTTTG GCTGGATGTC      600
40      CAGGCCGCCC TTCCTAGCAC TGCATTCAAT CTGCAGCTAC CCTCCATGCC TCTAGCTGTT      660
      GTGTCCATGG GAGAGCAGGG TGTCATTTCC CAGGTTAACC TTCTGTAAAC GCGGCCGCTT      720
      A

```

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 583 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:3:

```

60      CTCGAGCCAA AGTATGAACA AGTGGGTTTT CTGCTGGGTA ACCCTTTGTC TCCTTACTGT      60
      AGGTAAGGCT CTGGGCTCTC TGGGTTTCTG TTGCCGAGTG CACATCTTAA CCCCCCTGCC      120
      CTGGGTAGCA GTGCCAAACC CCTTCCAGAC TGATTCTTTT TCTTTTCCAG AGACCACACA      180
65      TGGTGATGGT GGCATCATTA CTCAGACACC CAAATTCCTG ATTGGTCAGG AAGGGCAAAA      240
      ACTGACCTTG AAATGTCAAC AGAATTTCAA TCATGATACA ATGTACTGGT ACCGACAGGA      300

```

ES 2 321 036 T3

	TTCAGGGAAA GGATTGAGAC TGATCTACTA TTCAATAACT GAAAACGGCG ATCTATCTGA	360
	AGGCTATGAT GCGTCTCGAG AGAAGAAGTC ATCTTTTTTCT CTCACTGTGA CATCTGCCCCA	420
5	GAAGAACGAG ATGGCCCTTT TTCTCTGTGC CAGCAGTATA TCCACAAACA ACCAGGCTCC	480
	GCTTTTTTGA GAGGGGACTC GACTCTCTGT TCTAGGTAAA CTATGGGACC AAAGTGGTGG	540
	GACCATTGTC CTTTGGACCT GGAGTGTCTC TGTAACCCCG CGG	583

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 403 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1..403

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:4:

	ATG AAC ACT TCT CCA GTT TTA GTG ACT GCG ATG CTG CTG TTC ATG CTT Met Asn Thr Ser Pro Val Leu Val Thr Ala Met Leu Leu Phe Met Leu 1 5 10 15	48
	GGG ATG AGA AAG ACC CAC GGA GGT TCA GTG ACC CAG AAA CAA GGT CAA Gly Met Arg Lys Thr His Gly Gly Ser Val Thr Gln Lys Gln Gly Gln 20 25 30	96
35	GTG ACC CTT TCA GAA GAT GAC TTC CTA TTT ATA AAT TGC ACT TAT TCT Val Thr Leu Ser Glu Asp Asp Phe Leu Phe Ile Asn Cys Thr Tyr Ser 35 40 45	144
40	ACC ACA ACG TAC CCA ACT CTT TTC TGG TAT GTC CAA TAT CCT GGA CAA Thr Thr Thr Tyr Pro Thr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Gly Gln 50 55 60	192
45	GGT CCA CAG CTC CTT CTG AAA GTC ACA ACT GCC AAC AAC AAG GGA ATC Gly Pro Gln Leu Leu Lys Val Thr Thr Ala Asn Asn Lys Gly Ile 65 70 75 80	240
	AGC AGA GGC TTT GAA GCT ACA TAT GAG AAA GGG ACC ACG TCC TTC CAC Ser Arg Gly Phe Glu Ala Thr Tyr Glu Lys Gly Thr Thr Ser Phe His 85 90 95	288
50	TTA CAG AAA GCC TCA GTG CAG GAG TCA GAC TCA GCC GTG TAC TTC TGT Leu Gln Lys Ala Ser Val Gln Glu Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys 100 105 110	336
55	GCT CTG GCC CCT TCC AAT ACC AAC AAA GTC GTC TTT GGA ACA GGG ACC Ala Leu Ala Pro Ser Asn Thr Asn Lys Val Val Phe Gly Thr Gly Thr 115 120 125	384
60	AGA TTA CAA GTA TTA CCA A Arg Leu Gln Val Leu Pro 130	403

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 134 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

ES 2 321 036 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:5:

```

Met Asn Thr Ser Pro Val Leu Val Thr Ala Met Leu Leu Phe Met Leu
 1      5      10      15
Gly Met Arg Lys Thr His Gly Gly Ser Val Thr Gln Lys Gln Gly Gln
 20      25      30
Val Thr Leu Ser Glu Asp Asp Phe Leu Phe Ile Asn Cys Thr Tyr Ser
 35      40      45
Thr Thr Thr Tyr Pro Thr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Gly Gln
 50      55      60
Gly Pro Gln Leu Leu Leu Lys Val Thr Thr Ala Asn Asn Lys Gly Ile
 65      70      75      80
Ser Arg Gly Phe Glu Ala Thr Tyr Glu Lys Gly Thr Thr Ser Phe His
 85      90      95
Leu Gln Lys Ala Ser Val Gln Glu Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
100      105      110
Ala Leu Ala Pro Ser Asn Thr Asn Lys Val Val Phe Gly Thr Gly Thr
115      120      125
Arg Leu Gln Val Leu Pro
130

```

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 462 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1..462

(D) OTRA INFORMACIÓN: /marcador= péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:6:

```

ATG AAC AAG TGG GTT TTC TGC TGG GTA ACC CTT TGT CTC CTT ACT GTA      48
Met Asn Lys Trp Val Phe Cys Trp Val Thr Leu Cys Leu Leu Thr Val
 1      5      10      15
GAG ACC ACA CAT GGT GAT GGT GGC ATC ATT ACT CAG ACA CCC AAA TTC      96
Glu Thr Thr His Gly Asp Gly Gly Ile Ile Thr Gln Thr Pro Lys Phe
 20      25      30

```

ES 2 321 036 T3

	CTG ATT GGT CAG GAA GGG CAA AAA CTG ACC TTG AAA TGT CAA CAG AAT	144
	Leu Ile Gly Gln Glu Gly Gln Lys Leu Thr Leu Lys Cys Gln Gln Asn	
	35 40 45	
5	TTC AAT CAT GAT ACA ATG TAC TGG TAC CGA CAG GAT TCA GGG AAA GGA	192
	Phe Asn His Asp Thr Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Ser Gly Lys Gly	
	50 55 60	
10	TTG AGA CTG ATC TAC TAT TCA ATA ACT GAA AAC GGC GAT CTA TCT GAA	240
	Leu Arg Leu Ile Tyr Tyr Ser Ile Thr Glu Asn Gly Asp Leu Ser Glu	
	65 70 75 80	
	GGC TAT GAT GCG TCT CGA GAG AAG AAG TCA TCT TTT TCT CTC ACT GTG	288
	Gly Tyr Asp Ala Ser Arg Glu Lys Lys Ser Ser Phe Ser Leu Thr Val	
	85 90 95	
15	ACA TCT GCC CAG AAG AAC GAG ATG GCC CTT TTT CTC TGT GCC AGC AGT	336
	Thr Ser Ala Gln Lys Asn Glu Met Ala Leu Phe Leu Cys Ala Ser Ser	
	100 105 110	
20	ATA TCC ACA AAC AAC CAG GCT CCG CTT TTT GGA GAG GGG ACT CGA CTC	384
	Ile Ser Thr Asn Asn Gln Ala Pro Leu Phe Gly Glu Gly Thr Arg Leu	
	115 120 125	
	TCT GTT CTA GGT AAA CTA TGG GAC CAA ACT GGT GGG ACC ATT GTC CTT	432
	Ser Val Leu Gly Lys Leu Trp Asp Gln Thr Gly Gly Thr Ile Val Leu	
	130 135 140	
25	TGG ACC TGG AGT GTC TCT GTA ACC CCG CGG	462
	Trp Thr Trp Ser Val Ser Val Thr Pro Arg	
	145 150	

30 (2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 154 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:7:

	Met Asn Lys Trp Val Phe Cys Trp Val Thr Leu Cys Leu Leu Thr Val	
	1 5 10 15	
45	Glu Thr Thr His Gly Asp Gly Gly Ile Ile Thr Gln Thr Pro Lys Phe	
	20 25 30	
	Leu Ile Gly Gln Glu Gly Gln Lys Leu Thr Leu Lys Cys Gln Gln Asn	
	35 40 45	
50	Phe Asn His Asp Thr Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Ser Gly Lys Gly	
	50 55 60	
	Leu Arg Leu Ile Tyr Tyr Ser Ile Thr Glu Asn Gly Asp Leu Ser Glu	
	65 70 75 80	
55	Gly Tyr Asp Ala Ser Arg Glu Lys Lys Ser Ser Phe Ser Leu Thr Val	
	85 90 95	
	Thr Ser Ala Gln Lys Asn Glu Met Ala Leu Phe Leu Cys Ala Ser Ser	
	100 105 110	
60	Ile Ser Thr Asn Asn Gln Ala Pro Leu Phe Gly Glu Gly Thr Arg Leu	
	115 120 125	
	Ser Val Leu Gly Lys Leu Trp Asp Gln Thr Gly Gly Thr Ile Val Leu	
	130 135 140	
65	Trp Thr Trp Ser Val Ser Val Thr Pro Arg	
	145 150	

ES 2 321 036 T3

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 40 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:8:

TTTGTTGGTA TTGGAAGGGG CCAGAGCACA GAAGTACACG

40

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 26 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: desconocido
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:9:

Pro	Thr	Gly	Pro	Leu	Gly	Pro	Lys	Gly	Gln	Thr	Gly	Glu	Leu	Gly	Ile
1				5					10					15	
Ala	Gly	Phe	Lys	Gly	Glu	Gln	Gly	Pro	Lys						
			20					25							