

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 407**

51 Int. Cl.:
C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07814544 .8**
- 96 Fecha de presentación: **29.08.2007**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2064325**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.06.2009**

54 Título: **Aumento de la expresión de inmunoglobulina humana o humanizada en animales transgénicos no humanos**

30 Prioridad:
01.09.2006 US 841890 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.04.2012

73 Titular/es:
**THERAPEUTIC HUMAN POLYCLONALS, INC.
3431 HILLVIEW AVENUE
PALO ALTO, CA 93404, US**

72 Inventor/es:
BUELOW, Roland

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 378 407 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aumento de la expresión de inmunoglobulina humana o humanizada en animales transgénicos no humanos

5 Campo de la invención

Esta invención está relacionada con un método para mejorar la expresión de inmunoglobulina humana en animales transgénicos no humanos mediante la promoción del desarrollo de células B normales y mediante el sostenimiento de la expresión de anticuerpos humanos en animales no humanos portadores del loci de inmunoglobulina humana. En particular, esta invención está relacionada con la expresión simultánea de transgenes que codifican Ig α y/o Ig β humana, componentes del receptor de linfocito B, y transgenes que codifican un locus o loci de inmunoglobulina humana. Este método permite la expresión dominante de anticuerpos humanos, por ejemplo en la sangre, leche o huevos de los animales transgénicos no humanos.

15 Descripción de la materia relacionada

Los anticuerpos son una clase importante de productos farmacéuticos que se han utilizado con éxito en el tratamiento de varias enfermedades y condiciones humanas, como el cáncer, enfermedades alérgicas, prevención del rechazo de un trasplante y enfermedad de huésped frente a injerto.

El principal problema de las preparaciones de anticuerpo obtenidas a partir de animales no humanos es la inmunogenicidad intrínseca de las inmunoglobulinas no humanas en pacientes humanos. Para poder reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos no humanos, se ha demostrado que al fusionar exones de la región variable (V) de animales con exones de la región constante (C) humana, se puede obtener un gen de anticuerpo quimérico. Dichos anticuerpos quiméricos o humanizados presentan una mínima inmunogenicidad en humanos y son apropiados para utilizar en el tratamiento terapéutico de sujetos humanos.

Se han desarrollado anticuerpos monoclonales humanizados y se utilizan en la práctica clínica. No obstante, el uso de anticuerpos monoclonales en general, ya sean quiméricos, humanizados o humanos, para el tratamiento de enfermedades devastadoras como el cáncer o infecciones con patógenos virulentos, está limitado debido a la complejidad, etiología multifactorial y adaptabilidad de estas enfermedades. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra dianas únicas normalmente fracasan cuando estas dianas cambian, evolucionan y mutan. Por ejemplo, las neoplasias pueden ganar resistencia a las terapias con anticuerpos monoclonales estándar. Una solución a este problema es utilizar anticuerpos policlonales que poseen la capacidad de dirigirse hacia una serie de dianas en evolución. Los anticuerpos policlonales pueden neutralizar toxinas bacterianas o virales, y dirigir respuestas inmunitarias para matar y eliminar a los patógenos.

De acuerdo con esto, existe una gran necesidad clínica de métodos adecuados para la producción a gran escala de anticuerpos monoclonales y policlonales de gran titulación, alta afinidad, humanizados. Además, debido a que la producción de anticuerpos en animales transgénicos más grandes como conejos, pollos, ovejas y vacas está favorecido desde un punto de vista de rendimiento del anticuerpo, la creación de animales fundadores más grandes que expresan mayores cantidades de productos codificados por transgenes también es muy deseable.

Los anticuerpos monoclonales humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos CDR, y posiblemente algunos residuos FR, están sustituidos por residuos de sitios análogos en animales no humanos, p.ej., anticuerpos de roedores. La humanización puede realizarse en esencia siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321: 522 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239: 1534 (1988)), mediante la sustitución de CDR de animales no humanos o secuencias de CDR (p.ej., roedores), por las correspondientes secuencias de un anticuerpo monoclonal humano.

Mientras se realizaban anticuerpos humanizados en animales, se encontró un problema que es la producción endógena de anticuerpos del huésped sobre el anticuerpo transgénico, que necesita ser suprimido. Se ha descrito que la delección homocigota del anticuerpo, gen de la región de unión de la cadena pesada (JH) en ratones quiméricos y mutantes en la línea germinal, resulta en la inhibición completa de la producción endógena del anticuerpo. La transferencia de un conjunto de genes de inmunoglobulina humana de línea germinal en dicho ratón mutante de línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos tras la presentación de antígenos. Véase, p.ej., Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993); N° de Patente Estadounidense 7.064.244 depositada el 20 de junio de 2006.

La introducción de genes de inmunoglobulina humana en el genoma de ratones resulta en la expresión de un repertorio diversificado de anticuerpos humanos en estos ratones modificados genéticamente. La generación de ratones que expresan anticuerpos quiméricos humano-ratón se han descrito en Pluschke et al., *Journal of Immunological Methods* 215: 27-37 (1998). La generación de ratones que expresan polipéptidos de inmunoglobulina humana se han descrito en Neuberger et al., *Nature* 338: 350-2 (1989); Lonberg et al., *Int. Rev. Immunol.* 13(1):65-93 (1995); y Bruggemann et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8(4): 455-8 (1997); Patente Estadounidense N° 5.545.806,

depositada en Agosto de 1996; Patente Estadounidense N° 5.545.807, depositada en Agosto de 1996 y Patente Estadounidense N° 5.569.825, depositada en Octubre de 1996. La generación de vacas que expresan anticuerpos humanos se ha descrito en Kuroiwa et al., Nature Biotech 20(9): 889-894 (2002). La producción de animales transgénicos no humanos que expresan transloci de inmunoglobulina humana o humanizada y la producción de anticuerpos de dichos animales transgénicos también se ha descrito en detalle en la Publicación PCT N° WO 92/03918, WO 02/12437, y en las Patentes Estadounidenses N° 5.814.318, y 5.570.429.

Los anticuerpos humanizados obtenidos presentan una mínima inmunogenicidad en humanos y son apropiados para su uso en el tratamiento terapéutico de sujetos humanos.

Mientras que las aproximaciones en ingeniería genética citadas anteriormente resulta en la expresión de polipéptidos de inmunoglobulina humana en ratones modificados genéticamente, el nivel de expresión de inmunoglobulina humana es inferior al normal. Esto puede ser debido a elementos regulatorios específico de especie en el loci de inmunoglobulina que son necesarios para una expresión eficiente de inmunoglobulinas. Tal como se ha demostrado en líneas celulares transfectadas, los elementos regulatorios presentes en los genes de inmunoglobulina humana puede que no funcionen de forma adecuada en animales no humanos. Se han descrito muchos elementos reguladores en genes de inmunoglobulina. Son de particular importancia los potenciadores (3') de las regiones constantes de cadena pesada y los potenciadores intrónicos en los genes de cadena ligera. Además, otros elementos de control, aún por identificar, pueden estar presentes en los genes de inmunoglobulina. Estudios en ratones han demostrado que la cola de membrana y la cola citoplasmática de la forma de membrana de las moléculas de inmunoglobulina juegan un papel importante en los niveles de expresión de anticuerpos quiméricos humano-ratón en el suero de ratones homocigotos para el gen humano C γ 1. Por lo tanto, para la expresión de genes de inmunoglobulina heterólogos en animales, es deseable sustituir secuencias que contienen elementos potenciadores y exones que codifican la cola transmembranal (exón M1) y la cola citoplasmática (exón M2) con secuencias que se encuentran normalmente en el animal en posiciones similares.

La expresión de la inmunoglobulina humana en estos animales genéticamente modificados puede también verse afectada por el desarrollo de células B de las células B humanos portadores de loci de inmunoglobulina humana o humanizada. La influencia del receptor de células B (BCR) sobre el desarrollo de células B se ha estudiado de forma extensa en ratones. No obstante, no está claro cómo un anticuerpo humano o parcialmente humano se combina para formar un BCR funcional, y cómo dicho BCR influirá de forma eficiente el desarrollo y supervivencia de células B no humanos que expresan Ig humano o humanizado, en animales transgénicos, que a su vez, afectarán a las proporciones de anticuerpo.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra un alineamiento de aminoácidos de la secuencia humana de polipéptido Ig α (Id. de sec. N°: 1) con otras secuencias Ig α no humanas (Id. de sec. N°: 2-6).

La figura 2 muestra un alineamiento de aminoácidos de la secuencia humana de polipéptido Ig β (Id. de sec. N°: 7) con otras secuencias Ig β no humanas (Id. de sec. N°: 8-12).

Resumen de la invención

En un aspecto, la descripción proporciona una construcción transgénica que codifica una subunidad Ig α quimérica del BCR, en el que la subunidad Ig α quimérica comprende una secuencia de dominio intracelular y una secuencia de dominio transmembranal de una secuencia no humana de polipéptido, Ig α ; y además, un polipéptido con al menos un 85% de identidad de secuencia con el dominio extracelular de Ig α humano de Id. de sec. N°: 1.

En otro aspecto, la descripción proporciona una construcción transgénica que codifica una subunidad Ig β quimérica del BCR, en el que la subunidad Ig β quimérica comprende una secuencia de dominio intracelular y una secuencia de dominio transmembranal de una secuencia no humana de polipéptido, Ig β ; y además, un polipéptido con al menos un 85% de identidad de secuencia con el dominio extracelular de Ig β humano de Id. de sec. N°:7.

En ciertos aspectos de la descripción el tipo de secuencia de polipéptido Ig α no humano incluye, pero no se limita a, a las secuencias bovina (Id. de sec. N°: 2); murina (Id. de sec. N°: 3); canina (Id. de sec. N°: 4); de primate (Id. de sec. N°: 5); de conejo (Id. de sec. N°: 6) u otras secuencias no humanas. En otro aspecto de la descripción, el tipo de secuencia de polipéptido Ig β no humano incluye, pero no se limita a, las secuencias canina (Id. de sec. N°: 8); de rata (Id. de sec. N°: 9); bovina (Id. de sec. N°: 10); murina (Id. de sec. N°: 11); de pollo (Id. de sec. N°: 12) u otras secuencias no humanas.

En un aspecto de la invención, los animales transgénicos no humanos seleccionados de un grupo que consiste de primates no humanos, conejos, ratones, ratas, cerdos, ovejas, cabras, caballos, burros, pollos, pavos, patos, gansos, y vacas comprende (a) una construcción transgénica que codifica una subunidad Ig α humana de longitud completa de Id. de sec. N°: 1, y/o, (b) una construcción transgénica que codifica una subunidad Ig β humana de longitud

completa de Id. de sec. N°: 7 y, (c) una construcción transgénica que codifica un locus de inmunoglobulina humana, en el que los productos transgénicos resultantes se combinan para formar un complejo de receptor de linfocito B humano.

5 En una realización de este aspecto, la expresión de cualquier producción de Ig endógena, y/o, expresión de subunidad Ig α endógena y/o Ig β endógena, de los animales transgénicos no humanos se reduce de forma sustancial.

10 En una realización preferible, los animales transgénicos no humanos son conejos.

10 En otro aspecto, la descripción también proporciona una inmunoglobulina humana o humanizada aislada de los animales transgénicos no humanos definidos anteriormente, que puede ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En cierta realización de este aspecto, la inmunoglobulina humana o humanizada aislada puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal, o alternativamente, es un fragmento de anticuerpo. El fragmento de anticuerpo puede ser de un de un anticuerpo monoclonal o policlonal. Además, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo puede marcarse, o fusionarse con una toxina para formar una inmunotoxina, o acoplado a un agente terapéutico, o fusionado con cualquier secuencia heteróloga de aminoácidos bien definida y utilizada en la materia. En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo es un fragmento Fc, Fv, Fab, Fab' o F(ab')₂.

20 En otro aspecto, la invención proporciona un linfocito B aislado de un animal transgénico no humano definido anteriormente, en el que el linfocito B expresa la subunidad nativa humana de Ig α de Id. de sec. N°: 1 y/o la subunidad nativa humana de Ig β de Id. de sec. N°: 7, y además, también expresa el locus de inmunoglobulina humana. En ciertas realizaciones, este linfocito B está inmortalizado y en una realización preferible, deriva de un conejo.

25 En otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo preparación que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, como se ha descrito anteriormente.

30 En otro aspecto, la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, como se ha descrito anteriormente, en una mezcla con un ingrediente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender tanto un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo, o uno o varios anticuerpos policlonales o fragmentos de los mismos.

35 En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir anticuerpos humanos en un animal no humano como se ha definido anteriormente que comprende: (a) introducir y expresar una construcción transgénica que codifica una subunidad Ig α nativa humana de Id. de sec. N°: 1 y/o una construcción transgénica que codifica una subunidad Ig β nativa humana de Id. de sec. N°: 7 en un animal no humano; y, (b) introducir y expresar una construcción transgénica que codifica un locus de inmunoglobulina humana en un animal no humano; (c) someter al animal a un estímulo antigénico; y (d) aislar anticuerpos humanos del animal. En cierta realización de este aspecto, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal, o es un fragmento de un anticuerpo monoclonal o policlonal. Además, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede estar marcado, o puede estar fusionado con una toxina para formar una inmunotoxina, o acoplado a un agente terapéutico, o puede estar fusionado con cualquier secuencia de aminoácido heteróloga.

45 En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir un animal no humano como se ha definido anteriormente que exprese anticuerpos humanos que comprende: (a) introducir y expresar una construcción transgénica que codifica una subunidad Ig α nativa humana de Id. de sec. N°: 1 y/o una construcción transgénica que codifica una subunidad Ig β nativa humana de Id. de sec. N°: 7 en un linfocito B de un animal no humano; y, (b) introducir y expresar una construcción transgénica que codifica un locus de inmunoglobulina humana en un animal no humano; en los que los productos transgénicos resultantes se combinan para formar un complejo receptor de linfocito B humano. En una realización, el animal no humano que expresa anticuerpos humanos es un animal que crea diversidad de anticuerpos mediante la conversión génica y/o hipermutación somática. En una realización preferible, el animal es un conejo.

55 Descripción detallada de la invención

Definiciones

60 A no ser que se defina de otra manera, los términos técnicos y científicos utilizados aquí, poseen el mismo significado que entiende de forma usual un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994), y March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., John Wiley & Sons (New York, NY 1992), proporcionan a un experto en la materia una guía general a muchos de los términos utilizados en la presente solicitud.

65

Un experto en la materia reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí, que pueden utilizarse en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no está limitada en ninguna medida a los métodos y materiales descritos. Se definen para la presente invención, los siguientes términos.

5 "Una construcción transgénica o construcción de expresión " tal como se define en este documento, se refiere a una molécula de DNA que contiene la secuencia codificante para al menos un transgén de interés junto con las secuencias regulatorias apropiadas necesarias para una expresión temporal, específica de célula y/o aumentada para el (los) transgén(es) de interés en las células diana de un animal transgénico no humano.

10 "Células B" se definen como un linaje de linfocitos B que son capaces de llevar a cabo una redistribución de segmentos de genes de inmunoglobulina y expresar genes de inmunoglobulina en alguna etapa de su ciclo de vida. Estas células incluyen, pero no se limitan a, prelinfocitos B de fase temprana, prelinfocitos B de fase tardía, prelinfocitos B de gran tamaño, prelinfocitos B pequeños, linfocitos B inmaduros, linfocitos B maduros, linfocitos B de memoria, células plasmáticas, etc.

15 El "Complejo receptor de células B (BCR) " tal como se define en este documento, se refiere al receptor multisubunidad de reconocimiento inmune expresado en células B, que incluye las siguientes subunidades: el receptor de antígeno (Ag), la inmunoglobulina unida a membrana (mig), la subunidad $Ig\alpha$ y la subunidad $Ig\beta$. El receptor de linfocito B, sus componentes, y su asociación con las cinco clases de inmunoglobulina se han descrito en Wienands et al., EMBO J. 9(2): 449-455 (1990), Venkitaraman et al., Nature 352: 777-781 (1991), Herren et al., Immunologic Res. 26(1-3): 35-43 (2002). Además, existen varias proteínas asociadas a BCR (BAP) que han sido clonadas y secuenciadas, pero su función sigue siendo desconocida, y su papel, como componente del BCR, ha sido cuestionado. Las proteínas asociadas a BCR han sido descritas por Adachi et al., EMBO J 15(7): 1534-1541 (1996) y Schamel et al., PNAS 100(17): 9861-9866 (2003).

25 Las "subunidades $Ig\alpha$ o $Ig\beta$ nativas" se refieren a secuencias de polipéptido de $Ig\alpha$ o $Ig\beta$ que aparecen de forma natural, que incluye alelos de subunidades de $Ig\alpha$ o $Ig\beta$ que aparecen de forma natural que se encuentran en un tipo determinado de animal, o en una especie relacionada. Estos también se refieren como "secuencias $Ig\alpha$ o $Ig\beta$ de longitud completa". La secuencia de polipéptido de $Ig\alpha$ humana se clonó por Flaswinkel et al., Immunogenetics 36 (4): 266-69 (1992); número de acceso M74721 (Figura 1, Id. de sec. N°: 1). La secuencia de polipéptido de $Ig\beta$ humana se clonó por Mueller et al., Eur. J. Biochem. 22, 1621-25 (1992); número de acceso M80461 (Figura 2, Id. de sec. N°: 7).

30 El término "humano o humanizado" se refiere a una secuencia totalmente humana o una secuencia que contiene una o más secuencias humanas. Así, el término, tal como se utiliza aquí, incluye secuencias humanas y humanizadas.

35 Una subunidad o proteína o polipéptido " $Ig\alpha$ quimérico" se refiere a una secuencia de polipéptido $Ig\alpha$ de un animal (p.ej.; rata, ratón, humano, conejo, pollo, etc.), en el que uno o más dominios del polipéptido $Ig\alpha$ está sustituido con un dominio o dominios correspondientes de un polipéptido de $Ig\alpha$ diferente de otro animal o especie, o con un dominio o dominios correspondientes de una versión alélica diferente de $Ig\alpha$, o de una variante de secuencia de $Ig\alpha$ con una o más sustituciones de aminoácidos, o de una variante de secuencia de $Ig\alpha$ con al menos un 85% de identidad de secuencia del dominio correspondiente de una secuencia de $Ig\alpha$ determinada. Los términos " $Ig\alpha$ quimérico" y " $Ig\alpha$ humana o humanizada" se utilizan de forma intercambiable en la especificación. Las secuencias de polipéptido $Ig\alpha$ (Id. de sec. N°: 2-6) de algunos animales no humanos también están definidos en la Figura 1.

40 Una subunidad o proteína o polipéptido " $Ig\beta$ quimérico" se refiere a una secuencia de polipéptido $Ig\beta$ de un animal (p.ej.; rata, ratón, humano, conejo, pollo, etc.), en el que uno o más dominios del polipéptido $Ig\beta$ está sustituido con un dominio o dominios correspondientes de un polipéptido de $Ig\beta$ diferente de otro animal o especie, o con un dominio o dominios correspondientes de una versión alélica diferente de $Ig\beta$, o de una variante de secuencia de $Ig\beta$ con una o más sustituciones de aminoácidos, o de una variante de secuencia de $Ig\beta$ con al menos un 85% de identidad de secuencia del dominio correspondiente de una secuencia de $Ig\beta$ determinada. Los términos " $Ig\beta$ quimérico" y " $Ig\beta$ humana o humanizada" se utilizan de forma intercambiable en la especificación. Las secuencias de polipéptido $Ig\beta$ (Id. de sec. N°: 8-12) de algunos animales no humanos también están definidos en la Figura 2.

45 "Dominio o polipéptido Intracelular" o "cola citoplasmática" se refiere a esa parte de la secuencia de polipéptido de una determinada proteína unida a membrana o subunidad que existe dentro de los límites de la célula. Normalmente, el dominio intracelular de la proteína es responsable de la transducción de señales.

50 Por "secuencia del dominio intracelular" de una subunidad $Ig\alpha$ o $Ig\beta$ se entiende por la secuencia de polipéptido del polipéptido $Ig\alpha$ o $Ig\beta$, o fragmentos del mismo, que normalmente existe dentro de los límites de la célula.

5 "Secuencia del dominio transmembrana" de una subunidad Ig α o Ig β se entiende por la secuencia de polipéptido del polipéptido Ig α o Ig β , o fragmentos del mismo, que abarca una membrana biológica como una membrana plasmática, orgánulo de membrana, o bicapa lipídica. La "secuencia del dominio transmembrana" tal como se define en este documento incluye polipéptidos naturales que abarcan la membrana, o pueden ser secuencias consenso no naturales, o fragmentos de las mismas.

10 "Dominio o polipéptido extracelular" se refiere a esa parte de la secuencia de polipéptido de una determinada proteína unida a membrana o subunidad que existe fuera de los límites de la célula. Por "dominio extracelular de Ig α o Ig β " se entiende la secuencia de polipéptido del polipéptido Ig α o Ig β , o fragmentos del mismo, que existe fuera de los límites de la célula.

15 El término "locus de inmunoglobulina humana o humanizada" tal como se utiliza aquí incluye ambas secuencias que aparecen de forma natural de una inmunoglobulina humana o locus génico de Ig o un segmento del mismo, formas degeneradas de secuencias que aparecen de forma natural de un locus génico de Ig humana o segmentos del mismo, así como secuencias sintéticas que codifican una secuencia de polipéptido sustancialmente idéntica a un polipéptido codificado por una secuencia que aparece de forma natural de un human locus génico de Ig humana o un segmento del mismo. En una realización particular, los segmentos génicos de Ig humana conserva la molécula de inmunoglobulina no inmunogénica en humanos. Aquí, los términos "locus de cadena ligera y/o pesada de inmunoglobulina (Ig) humana o humanizada" o "locus de inmunoglobulina o Ig humana o humanizada" se utilizan de forma intercambiable.

20 El término "complejo del receptor de linfocito B (BCR) humano o humanizado" tal como se utiliza aquí se refiere a aquellos complejos multisubunidad de BCR en los que la subunidad Ig α puede estar en su forma nativa, subunidad Ig α humana o una subunidad quimérica de Ig α que poseen secuencias de Ig α humana o humanizadas como se ha descrito anteriormente; y/o además, en que la subunidad Ig β puede estar en su forma nativa, subunidad Ig β humana o una subunidad quimérica de Ig β que poseen secuencias de Ig β humana o humanizadas como se ha descrito anteriormente; y además, cuando la inmunoglobulina unida a la membrana (mIg) es de una inmunoglobulina humana o humanizada, como se ha descrito anteriormente.

25 Los términos "anticuerpo humano" e "inmunoglobulina humana" se utilizan aquí para referirse a anticuerpos y moléculas de inmunoglobulina que comprende secuencias totalmente humanizadas.

30 Los términos "anticuerpos humanizados" e "inmunoglobulinas humanizadas" tal como se utiliza aquí, indica una molécula de inmunoglobulina que comprende al menos una porción de una secuencia de polipéptido de inmunoglobulina humana (o una secuencia de polipéptido codificada por un segmento génico de inmunoglobulina humana). Las moléculas de inmunoglobulina humanizadas de la presente invención pueden aislarse a partir de un animal transgénico no humano modificado para producir moléculas de inmunoglobulina humanizadas. Dichas moléculas de inmunoglobulina humanizadas son menos inmunogénicas para los primates, especialmente humanos, en relación a las moléculas de inmunoglobulina no humanizadas preparadas a partir de un animal o preparadas a partir de células derivadas del animal. Las inmunoglobulinas humanizadas o anticuerpos incluye inmunoglobulinas (Igs) y anticuerpos que están además diversificados a través de la conversión génica y las hipermutaciones somáticas en animales para conversión génica. Dichos anticuerpos o Ig humanizadas no son "humanos" ya que no se producen de forma natural en humanos (ya que los humanos no diversifican su repertorio de anticuerpos a través de la conversión génica) y además, los anticuerpos o Ig humanizados no son inmunogénicos en humanos ya que poseen secuencias de Ig humanas en su estructura.

35 Por el término producción de Ig endógena "sustancialmente reducida", y/o expresión de las subunidades Ig α y/o Ig β significa que el grado de producción tanto de la Ig endógena sola o adicionalmente, la expresión endógena de Ig α y/o Ig β se reduce preferiblemente en al menos alrededor de un 30%-49%, o más preferiblemente en al menos alrededor de un 50%-79%, o aún más preferiblemente en al menos alrededor de un 80-89%, o lo más preferible en al menos alrededor de un 90-100% en el animal transgénico.

40 El término "anticuerpo monoclonal" se utiliza para referirse a una molécula de anticuerpo sintetizada por un único clon de linfocito B.

45 El término "anticuerpo policlonal" se utiliza para referirse a una población de moléculas de anticuerpo sintetizadas por una población de células B.

50 Un "locus de inmunoglobulina (Ig)" con la capacidad de padecer una redistribución génica y conversión génica también se refiere aquí como un locus de Ig "funcional", y los anticuerpos con una diversidad generada por un locus de Ig funcional también se refiere aquí como anticuerpos "funcionales" o un repertorio de anticuerpos "funcional".

55 El término "animal (transgénico) no humano" tal como se utiliza aquí incluye, pero no se limita a, mamíferos como, por ejemplo, primates no humanos, roedores (p.ej., ratones y ratas), mamíferos no roedores, como, por ejemplo, conejos, cerdos, ovejas, cabras, vacas, caballos y burros, y pájaros (p.ej., pollos, pavos, patos, gansos y similares).

El término "animal no primate" tal como se utiliza aquí incluye, pero no se limita a, mamíferos diferentes de primates, lo que incluye pero no se limita a los mamíferos específicamente listados anteriormente.

Descripción detallada

5 Esta invención está basada, al menos en parte, en que el reconocimiento de la producción de inmunoglobulina humana o humanizada (incluyendo cadenas de inmunoglobulina) en un animal transgénico no humano puede aumentarse de forma significativa mediante la coexpresión de Ig α \square /o Ig β \square humanas o humanizadas en las células B del animal. La inclusión de Ig α \square /o Ig β \square humanas o humanizadas en los células B en animales transgénicos se cree que reconstituyen y mejoran las interacciones entre las proteínas de receptor B de linfocito, aumentando así el reconocimiento de antígeno, desarrollo de linfocito B y supervivencia de las células B portadores de dichos transgenes. La coexpresión de inmunoglobulina humanizada en animales transgénicos también portadores de transgenes de Ig α \square /o Ig β \square humanas o humanizadas mejorará enormemente la producción de inmunoglobulina humanizada. Será deseable expresar ambos, el transgén de Ig α \square /o Ig β \square humano o humanizado y el transgén de inmunoglobulina humanizada frente a un fondo genético en el que se ha eliminado, preferiblemente, ambas Ig endógenas, así como Ig α \square /o Ig β \square endógena.

Receptor de células B y sus proteínas asociadas.

20 El receptor de linfocito B consiste de una inmunoglobulina unida a membrana y un heterodímero transductor de señales, que consiste de dos glicoproteínas unidas por puentes disulfuro denominadas Ig α \square y Ig β \square . Además, se han descrito las proteínas asociadas a BCR (BAP).

25 La expresión de BCR es importante para el desarrollo de células B, selección y supervivencia. Estos procesos dependen de la señalización de BCR a través del heterodímero Ig α / Ig β \square . Los dominios citoplasmáticos de estas moléculas llevan un motivo de secuencia que contiene varios residuos de tirosina ensamblados en el denominado motivo de activación de inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM), que está fosforilado tras la activación de BCR.

30 Los experimentos de localización génica han demostrado que los dominios citoplasmáticos del heterodímero Ig α / Ig β son cruciales para el desarrollo de células B. Las señales transducidas por el heterodímero Ig α / Ig β están involucradas en ambas selecciones positiva y negativa del desarrollo de células B .

35 Una molécula de inmunoglobulina unida a membrana (mIg) consiste de dos cadenas pesadas, que forman un homodímero, y dos cadenas ligeras, cada uno de los cuales está unido de forma covalente a una de las cadenas pesadas. Al extremo N terminal la cadena pesada lleva un dominio VH, que, dependiendo del isotipo, está seguido por 4 (IgM, IgE), 3 (IgG, IgA) o 2 (IgD) dominios C. El sitio de unión a antígeno está formado por las regiones hipervariables de una pareja VH:VL. Así, cada molécula de mIg posee dos lugares de unión a antígeno.

40 La molécula de mIgM difiere de la forma secretada de IgM en la la IgM secretada forma un pentámero con 10 lugares de unión a antígeno potenciales. La pentamerización está controlada por secuencias en la parte C-terminal de la cadena ps secretada. Esta parte, que consta de 22 aminoácidos, está ausente en la cadena μ m unida a membrana, que en su lugar lleva 48 aminoácidos C-terminales codificados por los exones M1 y M2.

45 La parte específica μ m de la secuencia es la parte más conservada en la evolución de toda la molécula de IgM. Es casi idéntica entre la mIgM de ratones, conejos y humanos, y la conservación es también evidente si se compara la mIgM de ratones con la de tiburón. La conservación de aminoácidos es también evidente cuando uno compara la secuencia C-terminal de mIgM a la de otros isotipos de mIg de ratón. Este hallazgo proporciona evidencias que los aminoácidos transmembrana conservados interactúan entre ellos en el homodímero de la cadena H o con las subunidades Ig α e Ig β .

50 Ambas, Ig α e Ig β poseen un segmento transmembranal de 22 aminoácidos, seguido por una cola citoplasmática C-terminal de alrededor de 40-70 aminoácidos, que contiene varios residuos de tirosina. En el extremo N-terminal, ambas proteínas son portadoras de un péptido líder, seguido de un dominio extracelular que contiene residuos de cisteína, un triptófano, así como otros varios aminoácidos conservados que se encuentran en proteínas de la superfamilia de las Ig. Esto sugiere que las partes extracelulares de ambas subunidades Ig α e Ig β forman un dominio similar a Ig. Además las cisteínas que forman enlaces disulfuro intra-dominio, las secuencias Ig α e Ig β contienen cisteínas adicionales que presumiblemente forman enlaces disulfuro intercadena entre las subunidades Ig α e Ig β .

60 Una comparación entre la secuencia Ig α de ratón y la humana muestra que, todos los residuos importantes para la información del dominio Ig y los enlaces intercadena están conservados entre las Ig α de ambas especies. La comparación, no obstante, también muestra que la conservación de la secuencia en la parte extracelular solo es de alrededor del 56%, mientras que la cola transmembranal y citoplasmática muestra una conservación del 100% y del 87%, respectivamente. Esto último refleja la importancia de los residuos dentro de la parte C-terminal de la molécula.

65

El ensamblaje de la molécula de mIgM con el heterodímero Ig α /Ig β es necesario para la expresión en superficie de mIgM. Este requisito puede eliminarse mediante mutaciones de la parte transmembranal de la cadena μ m. Por ejemplo, la sustitución de la región transmembrana de la cadena μ m con la parte transmembrana de la molécula H-2K κ resulta en la expresión en superficie de mIgM independiente de Ig α /Ig β . Estos datos demuestran que la región transmembrana μ m es necesaria para las interacciones específicas entre la cadena μ m y el heterodímero Ig α /Ig β . Además, las células B poseen un mecanismo de control que previene el transporte de componentes sencillos o ensamblados de forma incompleta del complejo de proteínas transmembranales fuera del RE.

Aunque las porciones transmembranales del BCR son probablemente las estructuras más importantes que son necesarias para la formación del complejo BCR, el dominio Ig extracelular de Ig α e Ig β también se ha sugerido que juega un papel importante en la unión de la molécula de mIgM. Por ejemplo, en la línea celular de ratón J558L μ m, que no expresa la Ig α de ratón, la transfección con un transgén de Ig α reestablece la expresión en superficie de mIgM. Es interesante que la transfección con un gen de ratón de Ig α resulta en una expresión 10 veces superior que la transfección con un gen humano de Ig α . Este dato sugiere que el dominio extracelular de Ig α , de forma adicional, puede interactuar con las partes extracelulares de mIgM. Por otro lado, los ratones transgénicos con loci de inmunoglobulina humana expresan inmunoglobulinas humanas. No queda claro si el desarrollo de células B, la supervivencia de células B o la expresión de mIgM humana o humanizada en animales transgénicos no humanos se verá influido por la coexpresión de Ig α humana \square y/o Ig β humana en células B portadoras de genes mIgM humanas o humanizadas.

Además, existen varias proteínas asociadas a BCR (BAP) que se han clonado y secuenciado, pero que su(s) función(es) sigue(n) siendo desconocida(s). Aún cuando estas proteínas están asociadas con el BCR, su papel, como componentes del BCR, ha sido cuestionado. Aún así, la expresión ubicua y la fuerte conservación evolutiva de BAP sugiere que debe jugar un papel importante, posiblemente en los procesos celulares generales y se han propuesto varias presuntas funciones. Por ejemplo, estas proteínas pueden estar involucradas en el acoplamiento de BCR al citoesqueleto, o en el control del transporte vesicular. Por último, se ha propuesto que funcionan como chaperonas, ayudando al plegamiento y ensamblaje de las proteínas transmembranales.

Bibliografía relevante

El receptor de linfocito B, sus componentes, y su asociación con las cinco clases de inmunoglobulina se han descrito en Wienands et al., EMBO J. 9(2): 449-455 (1990), Venkitaraman et al., Nature 352: 777-781 (1991), Herren et al., Immunologic Res. 26(1-3): 35-43 (2002). las proteínas asociadas a BCR se han descrito en Adachi et al., EMBD J 15(7): 1534-1541 (1996) y Schamel et al., PNAS 100(17): 9861-9866 (2003). La influencia del receptor de linfocito B sobre el desarrollo de células B y la supervivencia se han descrito en Reth, Annual Reviews of Immunology 10: 97-121 (1992), Kraus et al., Cell 117(6): 787-800 (2004), Sayegh et al., Immunological Reviews 175: 187-200 (2000), Reichlin et al., Journal of Experimental Medicine 193(1): 13-23 (2001), Pike et al., Journal of Immunology 172: 2210-2218 (2004), Pelanda et al., Journal of Immunology 169: 865-872 (2002). La regulación de la señalización de BCR y su influencia en el desarrollo de células B y la apoptosis se ha descrito en Cronin et al., J. Immunology 161: 252-259 (1998), Muller et al., PNAS 97 (15): 8451-8454 (2000), Cragg et al., Blood 100: 3068-3076 (2002), Wang et al., J. Immunology 171: 6381-6388 (2003), Fuentes-Panana et al., J. Immunology 174: 1245-1252 (2005).

La presente invención por lo tanto está dirigida a los métodos para coexpresar human Ig α humana \square y/o Ig β en células B, en particular en animales transgénicos que son capaces de producir un repertorio diversificado de anticuerpos humanos para mejorar la supervivencia de células B en dichos animales transgénicos. Los tipos de animales incluyen animales no humanos grandes como conejos, pájaros, pollos, ovejas, cabras, vacas, cerdos, caballos y burros. Cuando estos animales expresan un translocus de Ig, debido a su gran tamaño, su cantidad de anticuerpo también será mayor. Así, esta invención tiene como objetivo crear animales fundadores más grandes para producir mayores cantidades de inmunoglobulinas humanas a través de la potenciación del desarrollo y supervivencia de células B.

De acuerdo con esto, la presente invención está dirigida a construcciones transgénicas que codifican polipéptidos de Ig α \square y Ig β humanas de longitud completa, tal como se define en detalle a continuación.

Por "transgén o construcción transgénica que codifica el polipéptido de la Ig α y/o Ig β humana" se entiende la secuencia de DNA nativa y completa, de la Ig α y/o Ig β humana respectivamente, así como cualquier secuencia de DNA variante, con codones optimizados que codifica un polipéptido funcionalmente equivalente de la Ig α y/o Ig β humana, pero que presenta una secuencia de DNA diferente basada en la degeneración de los codones. Este concepto se discute en más detalle a continuación. La secuencia polipeptídica nativa completa de la Ig α humana se define en el Id. de Sec. N $^{\circ}$: 1 (Figura 1). La secuencia polipeptídica nativa completa de la Ig β humana se define en el Id. de Sec. N $^{\circ}$: 7 (Figura 1).

También se hace referencia en esta descripción a una "molécula ácido nucleico o transgén o construcción transgénica que codifica la Ig α quimérica o humana o humanizada". Una subunidad o proteína o polipéptido de una "

Ig α quimérica" se refiere a una secuencia polipeptídica de la Ig α de un animal (por ejemplo rata, ratón, humano, conejo, pollo, etc.), en la que uno o más dominios del polipéptido de la Ig α están reemplazados por el dominio o dominios correspondientes de un polipéptido de la Ig α diferente de otro animal o especie, o por el correspondiente dominio o dominios de una versión alélica diferente de la Ig α , o por una secuencia variante de la Ig α con una o más sustituciones de aminoácidos, o por una secuencia variante de la Ig α con al menos un 85% de identidad de secuencia con el dominio correspondiente de una secuencia dada de la Ig α . Los términos "Ig α quimérica" y "Ig α humana o humanizada" se utilizan de forma intercambiable a lo largo de la especificación. Las secuencias polipeptídicas no humanas de la Ig α de las que pueden obtenerse las secuencias intracelulares y/o del dominio transmembrana incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a las secuencias bovinas (Id. de Sec. N°: 2), murinas (Id. de Sec. N°: 3), caninas (Id. de Sec. N°: 4), de primate (Id. de Sec. N°: 5), de conejo (Id. de Sec. N°: 6) o de otras especies no humanas.

También se hace referencia en esta descripción a una "molécula ácido nucleico o transgén o construcción transgénica que codifica la Ig β quimérica o humana o humanizada". Una subunidad o proteína o polipéptido de una "Ig β quimérica" se refiere a una secuencia polipeptídica de la Ig β de un animal (por ejemplo rata, ratón, humano, conejo, pollo, etc.), en la que uno o más dominios del polipéptido de la Ig β están reemplazados por el dominio o dominios correspondientes de un polipéptido de la Ig β diferente de otro animal o especie, o por el correspondiente dominio o dominios de una versión alélica diferente de la Ig β , o por una secuencia variante de la Ig β con una o más sustituciones de aminoácidos, o por una secuencia variante de la Ig β con al menos un 85% de identidad de secuencia con el dominio correspondiente de una secuencia dada de la Ig β . Los términos "Ig β quimérica" e "Ig β humana o humanizada" se utilizan de forma intercambiable a lo largo de la especificación. Las secuencias polipeptídicas no humanas de la Ig β de las que pueden obtenerse las secuencias intracelulares y/o del dominio transmembrana incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a las secuencias caninas (Id. de Sec. N°: 8), de rata (Id. de Sec. N°: 9), bovinas (Id. de Sec. N°: 10), murinas (Id. de Sec. N°: 11), de pollo (Id. de Sec. N°: 12) o de otras especies no humanas. Por lo tanto, brevemente, un transgén de la Ig α o de la Ig β quimérico consiste en 1) una secuencia nucleotídica que codifica el dominio extracelular de la Ig α o de la Ig β humana respectivamente, y 2) una secuencia nucleotídica que codifica el dominio transmembrana e intracelular de la Ig α o de la Ig β del animal transgénico huésped, respectivamente.

En otro aspecto, la presente invención también utiliza construcciones transgénicas que codifican inmunoglobulinas o loci human(izados) como se han descrito en solicitudes estadounidenses registradas anteriormente, ahora disponibles como la publicación U.S. 2003-0017534, publicada el 23 de enero de 2003 y la publicación U.S. 2006-0026696, publicada el 2 de febrero de 2006. Los animales transgénicos, las células B o las líneas celulares generadas en las mismas, y las metodologías relevantes que en éstas se describen también forman un aspecto de esta invención.

En una aproximación alternativa al aspecto mencionado anteriormente, la presente invención también utiliza las construcciones transgénicas que codifican la inmunoglobulina humana o humanizada o la cadena o loci de Ig, descritas en la patente estadounidense N° 5.545.806 depositada en agosto de 1996, la patente estadounidense N° 5.545.807, depositada en agosto de 1996 y la patente estadounidense N° 5.569.825, depositada en octubre de 1996, la patente estadounidense N° 7.064.244, depositada el 20 de junio de 2006, o en las publicaciones PCT N° WO 92/03918, WO 02/12437, y en las patentes estadounidenses N° 5.814.318 y 5.570.429; véase también Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol., 7: 33 (1993); Pluschke et al., Journal of Immunological Methods 215: 27-37 (1998); Neuberger et al., Nature 338: 350-2 (1989); Lonberg et al, Int. Rev. Immunol. 13(1): 65-93 (1995); y Bruggemann et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8(4): 455-8 (1997); y Kuroiwa et al., Nature Biotech 20(9): 889-894 (2002)

Los animales transgénicos, células B o líneas celulares generadas en las mismas, y las metodologías relevantes que se describen allí también forman parte de un aspecto de esta invención.

Los transgenes o construcciones transgénicas pueden introducirse en el genoma de un animal mediante una serie de técnicas, lo que incluye la microinyección de pronúcleos, la transfección, el clonaje por transferencia nuclear, la transferencia de genes mediada por esperma, la transferencia de genes mediada por testículos y similares.

En una realización, el gen de la Ig α o de la Ig β humana, preferiblemente se expresa en las células B del animal transgénico mediante un promotor específico inmune, preferiblemente un promotor específico de células B. Esta expresión del gen de la Ig α o de la Ig β humana sucede preferiblemente sólo en células B, lo que da lugar al desarrollo de células B mejoradas y mayor supervivencia del animal transgénico no humano. Por "promotor específico de células B" se entiende la secuencia promotora/ potenciadora de cualquier gen específico de células B, y/o las variantes o porciones modificadas de los mismos, que normalmente controlan la expresión de los genes que se expresan en las células B, cuyos ejemplos incluyen pero no se limitan a los promotores/ potenciadores de CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD40, CD72, Blimp-1, CD79b (también conocido como B29 o Ig beta), mb-1 (también conocido como Ig alfa), quinasa de tirosinas blk, VpreB, la cadena pesada de las inmunoglobulinas, cadena ligera kappa de las inmunoglobulinas, cadena ligera lambda de las inmunoglobulinas, cadena J de las

inmunoglobulinas, etc. En una realización preferible, el promotor/ potenciador de la CD79a, CD79b o de la cadena ligera kappa controla la expresión específica de las células B de los genes de la Ig α o de la Ig β humana.

5 En otra realización, la construcción transgénica que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica los genes de la Ig α y/o Ig β humana se coexpresa con la construcción transgénica que comprende una inmunoglobulina exógena o locus transgénico de una cadena de inmunoglobulinas (Ig). En esta realización, tanto el locus transgénico de Ig como el transgén de la Ig α y/o Ig β humana pueden estar presentes en el mismo vector de expresión transgénico o en dos vectores de expresión transgénicos diferentes. En este último caso, los dos vectores de expresión transgénicos pueden introducirse en el animal transgénico no humano al mismo tiempo o bien
10 secuencialmente.

De acuerdo con esta descripción, se incluyen variantes de longitud completa o sólo del dominio extracelular, de la Ig α or Ig β humana. Esto pretende indicar secuencias de ácido nucleico que permiten la degeneración del código genético, secuencias de ácido nucleico que codifican una secuencia polipeptídica que comprende sustituciones de aminoácidos de residuos equivalentes funcionalmente y/o mutaciones que potencian la funcionalidad del dominio extracelular. La "funcionalidad del dominio extracelular" incluye, pero no se limita a la formación de un BCR capaz de generar una transducción de señales.

15 Permitiendo la degeneración del código genético, la invención incluye secuencias con al menos alrededor del 70%, más frecuentemente alrededor del 80 a 85%, preferiblemente al menos alrededor del 90% y más preferiblemente alrededor del 95% de identidad de secuencia con la secuencia polipeptídica extracelular de la Ig α y Ig β humanas.

El término equivalente funcional a nivel biológico es bien entendido en la materia y se define aquí en más detalle. De acuerdo con esto, las secuencias que poseen entre un 70% y alrededor del 80%; o más preferiblemente, entre
25 alrededor del 81 % y alrededor del 90%; o incluso más preferiblemente, entre alrededor del 91 % y alrededor del 99% de identidad a nivel de aminoácidos se consideran equivalentes funcionalmente con la Ig α y Ig β humanas, siempre que la actividad biológica de las proteínas se mantenga.

El término codón equivalente a nivel funcional se utiliza aquí para referirse a los codones que codifican el mismo aminoácido, como los seis codones de la arginina o serina, y también se refiere a los codones que codifican aminoácidos equivalentes a nivel biológico.

La siguiente discusión se basa en el cambio de los aminoácidos de una proteína para crear un equivalente, o incluso una molécula mejorada de segunda generación. Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura proteica sin una pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva con estructuras como, por ejemplo, las regiones de unión a antígeno de los anticuerpos o lugares de unión sobre las moléculas de sustrato. Ya que la capacidad de interaccionar y la naturaleza de una proteína es lo que define la actividad funcional biológica de esa proteína, ciertas sustituciones de aminoácido pueden realizarse en una secuencia de proteínas, y en la secuencia subyacente de DNA que la codifica, y sin embargo obtener una proteína con las mismas propiedades. Por lo tanto, los inventores contemplan que pueden realizarse varios cambios en las secuencias de DNA de los genes sin una pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica, como se discute a continuación.

Al realizar estos cambios, también debe considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos en conferir una función biológica de interacción con una proteína se conoce generalmente bien en la materia (Kyte & Doolittle, 1982). Se acepta que el carácter hidropático relativo de los aminoácidos contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, DNA, anticuerpos, antígenos y similares.

También se entiende en la materia que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse de forma efectiva en base a su hidrofiliidad. La patente estadounidense N° 4.554.101 indica que una mayor hidrofiliidad local de promedio en una proteína, gobernada por la hidrofiliidad de aminoácidos adyacentes, correlaciona con una propiedad biológica de la proteína. Como se detalla en la patente estadounidense N° 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a los residuos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 +-,1); glutamato (+3,0,+-,1); serina (+0,3); asparagina (+0,2), glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5,+-,1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (- 1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5) y triptófano (-3,4).

Se entiende que un aminoácido puede sustituirse por otro con un valor de hidrofiliidad similar y aun así producir una proteína equivalente a nivel biológico e inmunológico. En tales cambios, es preferible la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están entre +-,2, aquellos que están entre +-,1 son particularmente preferibles y aquellos entre +-,0,5 son incluso más particularmente preferibles.

Como se remarca aquí, las sustituciones de aminoácido generalmente se basan en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral de los aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares. Ejemplos de sustituciones que tienen en consideración las anteriores distintas características son bien
65

conocidos por los expertos en la materia e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

5 Otra realización para la preparación de polipéptidos de acuerdo con la invención es la utilización de miméticos de péptido. Los miméticos son moléculas que contienen péptidos que mimetizan elementos de la estructura secundaria de una proteína (Johnson 1993). El racional subyacente al uso de miméticos de péptidos es que el esqueleto peptídico de las proteínas existe principalmente para orientar las cadenas laterales de los aminoácidos de forma que se faciliten las interacciones moleculares, como las que ocurren entre un anticuerpo y un antígeno. Es esperable que un mimético de péptido permita unas interacciones moleculares similares a las de la molécula natural. Estos principios pueden utilizarse, en conjunto con los principios remarcados anteriormente, para diseñar moléculas de segunda generación con muchas de las propiedades naturales de la Ig α o de la Ig β humana con características alteradas y mejoradas.

15 Por lo tanto, las secuencias variantes de ácido nucleico que codifican la Ig α o Ig β humana y los polipéptidos funcionalmente equivalentes de la Ig α o Ig β humana son útiles en esta invención.

20 Los vectores transgénicos que contienen los genes de interés pueden introducirse en la célula o células recipiente y luego integrarse en el genoma de la célula o células recipiente mediante integración al azar o mediante una integración dirigida.

25 Para la integración al azar, puede introducirse un vector transgénico que contiene una Ig α o Ig β humana en una célula animal recipiente mediante la tecnología estándar para obtener transgénicos. Por ejemplo, puede inyectarse directamente un vector transgénico en el pronúcleo de un oocito fertilizado. Un vector transgénico también puede introducirse mediante coincubación de espermatozoides con el vector transgénico antes de la fertilización del oocito. Los animales transgénicos pueden desarrollarse a partir de oocitos fertilizados. Otra forma de introducir un vector transgénico es transfectar células madre embrionarias y a continuación inyectar las células madre embrionarias modificadas genéticamente en embriones en desarrollo. Alternativamente, un vector transgénico (desnudo o en combinación con reactivos facilitadores) pueden inyectarse directamente en un embrión en desarrollo. En último lugar, los animales quiméricos transgénicos se producen a partir de los embriones que contienen el transgén de la Ig humana o humanizada integrada en el genoma de al menos algunas células somáticas del animal transgénico.

35 En una realización particular, un transgén que contiene una Ig α o Ig β humana se integra al azar en el genoma de las células recipiente (como los oocitos fertilizados o embriones en desarrollo) derivadas de líneas de animales con una expresión alterada de las Ig α o Ig β endógenas. La utilización de tales líneas de animales permite la expresión preferencial de las moléculas de inmunoglobulina a partir del locus de Ig transgénico humano o humanizado. Alternativamente, los animales transgénicos con transgenes de la Ig α o Ig β humanos o humanizados pueden cruzarse con líneas de animales con una expresión alterada de las Ig α o Ig β endógenas. Pueden obtenerse descendientes homocigotos con una expresión alterada de la Ig α o Ig β y con Ig α o Ig β humana o humanizada. Alternativamente, la expresión de la Ig α y/o Ig β endógena puede inhibirse o reducirse utilizando la tecnología de antisentidos, la expresión de anti-Ig α y/o Ig β intracelular, y similares. En una realización, el método de elección para eliminar la producción endógena de Ig α y/o Ig β de los animales huésped es el método del RNA de interferencia (RNAi), que introduce un RNA de doble cadena (dsRNA) o más preferiblemente, un dúplex de RNA corto o pequeño de interferencia (siRNA) en las células B que poseen secuencias de ácido nucleico intracelulares de las Ig α y/o Ig β del animal huésped. Esto puede conseguirse utilizando equipos disponibles a nivel comercial, lo que incluye pero no se limita a los equipos de RNA Block iT™ o Stealth™ de Invitrogen Corp.

45 Para la integración dirigida, puede introducirse un vector transgénico en las células animales recipiente apropiadas como las células madre embrionarias o células somáticas ya diferenciadas. A continuación, las células en las que el transgén se ha integrado en genoma del animal y ha reemplazado el correspondiente gen endógeno mediante recombinación homóloga puede seleccionarse mediante métodos estándar (véase por ejemplo, Kuroiwa et al. Nature Genetics 2004, 6 de Junio). Entonces pueden fusionarse las células seleccionadas con células unidad de transferencia nuclear enucleadas, por ejemplo oocitos o células madre embrionarias, que son totipotentes y capaces de formar un neonato funcional. La fusión se realiza de acuerdo con las técnicas convencionales que están bien establecidas. La enucleación de los oocitos y la transferencia nuclear también puede realizarse mediante microcirugía utilizando pipetas de inyección (véase, por ejemplo, Wakayama et al., Nature (1998) 394:369). Las células embrión resultantes se cultivan entonces en un medio apropiado y se transfieren a recipientes sincronizados para generar animales transgénicos. Alternativamente, las células modificadas genéticamente seleccionadas pueden inyectarse en embriones en desarrollo que a continuación se desarrollan en animales quiméricos.

50 Además, de acuerdo con la presente invención, también puede obtenerse un animal transgénico capaz de producir una Ig α y/o Ig β humana o humanizada introduciendo en una célula o células recipiente, una o más de los vectores recombinantes descritos aquí anteriormente, uno de los cuales es portador de un segmento del gen de la Ig α o Ig β humana, acoplado a las secuencias flanqueantes 5' y 3' que son homólogas a las secuencias flanqueantes del segmento del gen de la Ig α o Ig β endógenas, seleccionándose así las células en las que el segmento del gen de la Ig α o Ig β endógena está reemplazado por el segmento del gen de la Ig α o Ig β humana mediante una recombinación

homóloga, y se deriva un animal a partir de la célula o células recipiente modificadas genéticamente seleccionadas.

De forma similar a la inserción dirigida de un vector transgénico, las células apropiadas para su utilización como células recipiente en esta aproximación incluyen las células madre embrionarias o las células somáticas ya diferenciadas. Un vector recombinante portador de un segmento de un gen de la Ig α o Ig β humana puede introducirse en tales células recipiente mediante cualquier métodos factible, por ejemplo, la transfección. Después, las células en las que el segmento de un gen de la Ig α y/o Ig β humana ha reemplazado al correspondiente segmento génico de la Ig α y/o Ig β endógeno mediante recombinación homóloga, puede seleccionarse mediante métodos estándar. Estas células modificadas genéticamente pueden servir como células donadoras de núcleos en un procedimiento de transferencia nuclear para el clonaje de un animal transgénico. Alternativamente, las células madre embrionarias modificadas genéticamente seleccionadas pueden inyectarse en embriones en desarrollo que subsiguientemente pueden acabar desarrollando animales quiméricos.

En una realización específica, las construcciones transgénicas de la invención pueden introducirse en el animal transgénico durante la vida embrionaria mediante la inyección de los transgenes directamente en el embrión o la inyección indirectamente de los mismos en una hembra embarazada o en una gallina que ha puesto huevos. Los animales transgénicos producidos mediante cualquiera de los métodos anteriores forman otra realización de la presente invención. Los animales transgénicos poseen al menos uno, es decir, uno o más, genes de la Ig α y/o Ig β humana o humanizada en el genoma, a partir del cual puede producirse una proteína funcional Ig α y/o Ig β humana o humanizada.

Además, las construcciones transgénicas de la invención, es decir, el transgén de la Ig α y/o Ig β humana o humanizada y el transgén de la inmunoglobulina humanizada, se expresan preferiblemente frente a un fondo genético en el que se han eliminado la expresión de una, o más preferiblemente ambas, Ig endógenas, así como un fondo en el que se ha eliminado la expresión de la Ig α y/o Ig β endógena. Así, los animales transgénicos de la presente invención son capaces de reordenar los loci de la Ig humana o humanizada y expresar de forma eficiente un repertorio funcional de anticuerpos humanos o humanizados frente a un fondo genético con una expresión sustancialmente reducida de Ig endógena y más preferiblemente, también sustancialmente reducida de la Ig α y/o Ig β endógena. En este contexto, con "sustancialmente" se indica que el grado de producción endógeno, de expresión de la Ig endógena sola o adicionalmente, de la expresión de la Ig α y/o Ig β endógena, se reduce preferiblemente al menos en alrededor del 30%-49%, o más preferiblemente al menos en alrededor del 50-79%, o aún más preferiblemente al menos en alrededor del 80-89%, o más preferiblemente en alrededor del 90-100%.

La presente invención proporciona conejos transgénicos que expresan uno o más locus de la Ig humana y de la Ig α y/o Ig β humana de acuerdo con el Id. de Sec. N^o: 1 y 7, respectivamente, que son capaces de reordenar y provocar una conversión génica en el locus de la Ig humana, y expresan un repertorio funcional de anticuerpos humanos. Preferiblemente, estos conejos, adicionalmente, no producen cantidades sustanciales de inmunoglobulinas de conejo funcionales endógenas, o Ig α y/o Ig β de conejo funcional endógena.

La presente invención también proporciona otros animales transgénicos mayores, lo que incluye pero no se limita a, aves, roedores y animales de granja como vacas, cerdos, ovejas, cabras, burros, caballos y similares que expresan uno o más loci de Ig humana y Ig α y/o Ig β de acuerdo con el Id. de Sec. N^o 1 y 7, respectivamente. De nuevo, preferiblemente, estos animales, adicionalmente, no producen cantidades sustanciales de inmunoglobulinas endógenas funcionales, o Ig α y/o Ig β endógena funcional. Por lo tanto, estos animales transgénicos son capaces de reordenar el locus de la Ig humana o humanizada, y expresan eficientemente un repertorio funcional de anticuerpos humanos o humanizados, con un rendimiento aumentado.

La invención también está dirigida a células B aisladas de los diferentes tipos de animales transgénicos descritos anteriormente, que expresan el gen de la Ig α y/o Ig β humana de acuerdo con el Id. de Sec. N^o 1 y 7, respectivamente, y el loci de la inmunoglobulina humana. Además, tales células B pueden immortalizarse utilizando los métodos convencionales conocidos y utilizados por los expertos en la materia, lo que incluye pero no se limita a, la utilización de la transformación viral, etc.

La inmunización con antígeno da lugar a la producción de anticuerpos humanos o humanizados frente al mismo antígeno en dichos animales transgénicos.

Una vez se obtiene un animal transgénico no humano capaz de producir moléculas de inmunoglobulina humana o humanizada diversificada (como se establece a continuación), pueden obtenerse inmunoglobulinas humanas o humanizadas y preparaciones de anticuerpos humanos o humanizados frente a un antígeno, inmunizando el animal con el antígeno. Pueden utilizarse una variedad de antígenos para inmunizar un animal transgénico huésped. Estos antígenos incluyen microorganismos, por ejemplo virus y organismos unicelulares (como bacterias y hongos), vivos, atenuados o muertos, fragmentos de los microorganismos, o moléculas antigénicas aisladas de los microorganismos.

Los antígenos bacterianos preferibles para su utilización en la inmunización de un animal incluyen antígenos

- 5 purificados a partir de *Staphylococcus aureus* como los polisacáridos capsulares tipo 5 y 8, las versiones recombinantes de los factores de virulencia como la alfa-toxina, proteínas de unión a adhesina, proteínas de unión a colágeno y proteínas de unión a fibronectina. Los antígenos bacterianos preferibles también incluyen una versión atenuada de *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, enterococcus, enterobacter y *Klebsiella pneumoniae*, o los sobrenadantes de cultivo de estas células bacterianas. Otros antígenos bacterianos que pueden utilizarse en la inmunización incluyen el lipopolisacárido purificado (LPS), antígenos capsulares, polisacáridos capsulares y/o versiones recombinantes de las proteínas de la membrana externa, proteínas de unión a fibronectina, endotoxina y exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*, enterococcus, enterobacter y *Klebsiella pneumoniae*.
- 10 Los antígenos preferibles para la generación de anticuerpos frente a hongos incluyen una versión atenuada de los hongos o las proteínas de membrana de los mismos, y estos hongos incluyen, pero no se limitan a *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Cryptococcus neoformans*.
- 15 Los antígenos preferibles para su utilización en la inmunización para generar anticuerpos frente a virus incluyen las proteínas de cubierta y versiones atenuadas de virus, lo que incluye, pero no se limita al virus respiratorio sincitial (VRS) (en particular la proteína F), virus de la hepatitis C (VHC), el virus de la hepatitis B (VHB), citomegalovirus (CMV), EBV y VHS.
- 20 Pueden generarse anticuerpos terapéuticos para el tratamiento del cáncer inmunizando animales transgénicos con células tumorales aisladas o líneas celulares tumorales; antígenos asociados a tumores que incluyen pero no se limitan al antígeno Her-2-neu (los anticuerpos contra éste son útiles para el tratamiento del cáncer de mama), antígenos CD19, CD20, CD22 y CD53 (los anticuerpos contra éstos son útiles para el tratamiento de los linfomas de células B), (3) antígeno de membrana específico de prostate (PMSA) (los anticuerpos contra éste son útiles para el tratamiento del cáncer de próstata), y la molécula 17-1A (los anticuerpos contra éste son útiles para el tratamiento del cáncer de colon).
- 25 Los antígenos pueden administrarse a un animal huésped transgénico de cualquier modo conveniente, con o sin un adyuvante, y pueden administrarse de acuerdo con un programa predeterminado.
- 30 Tras la inmunización, puede fraccionarse el suero o la leche del animal transgénico inmunizado para la purificación de anticuerpos policlonales de grado farmacéutico específicos del antígeno. En el caso de las aves transgénicas, los anticuerpos también pueden obtenerse fraccionando la yema de sus huevos. Puede obtenerse una fracción de inmunoglobulina concentrada purificada mediante cromatografía (de afinidad, de intercambio iónico, de filtración en gel, etc.), precipitación selectiva con sales como el sulfato de amonio, solventes orgánicos como el etanol, o polímeros como el polietilenglicol.
- 35 Los anticuerpos fraccionados humanos o humanizados pueden disolverse o diluirse en medios no tóxicos, no pirogénicos adecuados para su administración intravenosa en humanos, por ejemplo, salina tamponada estéril.
- 40 Las preparaciones de anticuerpo utilizadas para su administración generalmente se caracterizan por tener concentraciones de inmunoglobulina de entre 0,1 y 100 mg/ml, más frecuentemente de 1 a 10 mg/ml. La preparación de anticuerpo puede contener inmunoglobulinas de varios isotipos. Alternativamente, la preparación de anticuerpo puede contener anticuerpos de sólo un isotipo, o un número de isotipos seleccionados.
- 45 Para obtener un anticuerpo monoclonal humano o humanizado, se aíslan células del bazo del animal transgénico inmunizado en las que las células B que expresan la inmunoglobulina endógena del animal se han eliminado. Las células del bazo aisladas se utilizan en una fusión celular con líneas celulares transformadas para la producción de hibridomas, o se clonan segmentos de cDNA que codifican anticuerpos mediante técnicas estándar de biología molecular y se expresan en células transfectadas. Los procedimientos para obtener anticuerpos monoclonal están bien establecidos en la materia. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente europea 0 583 980 A1 ("Method For Generating Monoclonal Antibodies From Rabbits"), la patente estadounidense N° 4.977.081 ("Stable Rabbit-Mouse Hybridomas and Secretion Products Thereof"), la WO 97/16537 ("Stable Chicken B Cell Line and Method of Use Thereof") y la EP 0 491 057 B1 ("Hybridoma Which Produces Avian Specific Immunoglobulin G"). La producción in vitro de anticuerpos monoclonales a partir de moléculas de cDNA clonadas ha sido descrita por Andris-Widhopf et al., "Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display", *J Immunol Methods* 242:159 (2000), y por Burton, D. R., "Phage display", *Immunotechnology* 1:87 (1995).
- 50 En la mayoría de ejemplos, la preparación de anticuerpo consiste en inmunoglobulinas no modificadas, es decir, anticuerpos humanos o humanizados preparados a partir del animal sin ninguna modificación adicional, por ejemplo, mediante agentes químicos o enzimas. Alternativamente, la fracción de inmunoglobulina puede estar sometida a tratamientos como la digestión enzimática (por ejemplo con pepsina, papaína, plasmina, glucosidasas, nucleasas, etc.), calor, etc., y/o posterior fraccionamiento para generar "fragmentos de anticuerpo".
- 55 La presente descripción también incluye composiciones farmacéuticas o preparaciones de anticuerpo que comprenden los anticuerpos o sus fragmentos obtenidos mediante los métodos definidos anteriormente. El término "ingrediente farmacéuticamente aceptable" o "formulación" como se utiliza aquí pretende incluir un producto que
- 60
- 65

comprende el(los) ingrediente(s) activo(s) reivindicado(s), es decir el anticuerpo humano o humanizado o el fragmento de anticuerpo, en cantidades específicas, así como cualquier producto que resulte, directamente o indirectamente, de la combinación del (de los) ingrediente(s) activo(s) especificado(s) en las cantidades especificadas. Dicho término pretende incluir un producto que comprende el(los) ingrediente(s) activo(s), y el(los) ingrediente(s) inerte(s) que funcionan como transportador, así como cualquier producto que resulte, directamente o indirectamente, de la combinación, acomplexado o agregación de dos o más de entre cualquiera de los ingredientes, o de la disociación de uno o más de los ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes. De acuerdo con esto, las "composiciones farmacéuticas" de la presente invención incluyen cualquier composición obtenida al mezclar cualquier compuesto activo de la presente invención y un transportador farmacéuticamente aceptable.

Los términos "administración de" y "administrar un" compuesto debe entenderse que significan proporcionar cualquier compuesto activo de la invención, en cualquier formulación, a un individuo con necesidad de un tratamiento.

Las composiciones farmacéuticas para la administración de los compuestos de esta invención pueden presentarse de forma conveniente en formas de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante métodos bien conocidos en farmacia. Los métodos y transportadores adecuados para su utilización son aquellos que están bien descritos en la materia, por ejemplo, en Remington, The Science and Practice of Pharmacy, Ed. Gennaro et al., 20ª Ed. (2000), aunque el experto en el área de la inmunología reconocerá rápidamente que existen otros métodos y que son adecuados para preparar las composiciones de la presente invención. Todos los métodos incluyen el paso de poner en asociación en ingrediente activo con el transportador que constituye uno o más ingredientes adicionales. En general, las composiciones farmacéuticas se preparan mediante una asociación uniforme e íntima del ingrediente activo con un transportador líquido o un transportador sólido finamente dividido o ambos, y luego, si es necesario, se le da forma al producto en la formulación deseada. En la composición farmacéutica, el ingrediente activo se incluye en una cantidad efectiva, que se ha discutido anteriormente, suficiente para producir el efecto deseado sobre el proceso o estado de las enfermedades. Además, se han descrito formulaciones para la liberación controlada y prolongada de moléculas de anticuerpo en la patente estadounidense N° 6.706.289. Así, las construcciones transgénicas, los vectores que comprenden las construcciones transgénicas y los animales transgénicos generados utilizando los métodos descritos anteriormente son todos ellos realizaciones de la invención. La invención se ilustra en más detalle, pero en modo alguno se ve limitada, en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Transfección de una línea de células B de conejo con Igα e Igβ humana.

Para demostrar el efecto de la Igα e Igβ humana sobre la expresión de mIgM humana en células B de conejo, tales células se transfectan con vectores de expresión que codifican Igα e Igβ humana o una mIgM humana.

Los genes que codifican las Igα e Igβ humanas e IgM humana se clonaron en vectores de expresión.

Una línea de células B de conejo inmortalizada se transfectó con los vectores de expresión y se cultivaron en un medio en presencia de neomicina para la selección de transfectantes estables. Las células resistentes se analizaron mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos para IgM humana e Igα e Igβ humanas. La transfección de células B de conejo con un vector de expresión que codifica la IgM humana resulta en una baja expresión en la superficie celular de IgM humana. La cotransfección con Igα y/o Igβ humana □ resulta en una alta expresión en la superficie celular de mIgM humana. Esto demuestra que la Igα y/o Igβ humanas son necesarias y suficientes para una alta expresión en la superficie celular de mIgM humana o quimérica.

Ejemplo 2

Transfección de una línea de células B derivada de cualquier animal con Igα e Igβ humana

Para demostrar el efecto de Igα e Igβ humana sobre la expresión de mIgM humana en células B derivadas de animales, los vectores de expresión que codifican Igα o Igβ humana o una mIgM humana se transfectaron en células B derivadas de pollo (DT40), vaca, y cerdos.

Las líneas celulares de células B inmortalizadas se transfectaron con los vectores de expresión y se cultivaron en un medio en presencia de neomicina para la selección de transfectantes estables. Las células resistentes se analizaron mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos para IgM humana e Igα e Igβ humanas. La transfección de células B de conejo con un vector de expresión que codifica la IgM humana resulta en una baja expresión en la superficie celular de IgM humana. La cotransfección con Igα y/o Igβ humana □ resulta en una alta expresión en la superficie celular de mIgM humana. Esto demuestra que la Igα y/o Igβ humanas son necesarias y suficientes para una alta expresión en la superficie celular de mIgM humana o quimérica.

Ejemplo 3

Conejos transgénicos que expresan el transgén de las cadenas ligera y/o pesada de inmunoglobulina humanizada con o sin Ig α y/o Ig β humana

5 Los conejos transgénicos se generaron como se describe en Fan et al. (Pathol. Int. 49: 583-594, 1999). Resumiendo, se superovularon conejos hembra utilizando métodos estándar y se emparejaron con conejos macho. Se recogieron cigotos en estadio pronuclear recogidos de los oviductos y se colocaron en un medio adecuado como tampón salino fosfato de Dulbecco suplementado con suero fetal bovino al 20%. El DNA exógeno (p.ej., vectores de expresión que contienen el locus de inmunoglobulina humana o humanizada o Ig α o Ig β humana) se microinyectaron en el pronúcleo con la ayuda de un par de manipuladoras. Los cigotos morfológicamente vivos se transfirieron a los oviductos de los conejas pseudoembarazadas. El pseudoembarazo se indujo mediante la inyección de gonadotropina coriónica humana (hCG). Entre alrededor de un 0,1-1% de los cigotos inyectados desarrollaron un conejo transgénico vivo. La integración del transgén en el genoma se confirmó mediante PCR y FISH.

15 La presencia de anticuerpos que contienen IgG humana y/o determinantes antigénicos de la cadena ligera kappa humana en el suero de conejos fundadores transgénicos se determinó utilizando un ensayo ELISA. La expresión de anticuerpos en la superficie de células B se analizó mediante citometría de flujo. Los conejos con un transgén que codifica un locus humano de la cadena pesada de inmunoglobulina, expresó 1-10 ug/ml de IgM humana. Los animales jóvenes (6-9 semanas) expresaron 100-4000 ug/ml IgG humanas. Sin embargo, la expresión de IgG humana descendió rápidamente hasta niveles de 10-100 ug/ml. El análisis de citometría de flujo de las células B en sangre periférica reveló una pequeña población de células positivas para la mIgM humana (1-2%). El apéndice de los conejos jóvenes contenía hasta un 10% de células positivas para la mIgM humana que desaparecían rápidamente con la edad.

25 La introducción de transgenes que codifican la Ig α y/o Ig β humana resulta en la expresión de 100-2000 ug/ml de IgM humana en el suero y en la expresión estable de 2000-12.000 ug/ml de IgG humana. En el apéndice, el 30-70% de los linfocitos son mIgM humana +. En sangre periférica, un número equivalente de células B expresan la mIgM o mIgG de conejo y humana.

30 Aunque la invención se ilustra en referencia a ciertas realizaciones, no es tan limitada. Un experto en la materia entenderá que varias modificaciones están fácilmente disponibles y pueden realizarse sin realizar cambios sustanciales en el modo de funcionamiento de la invención. Se pretende específicamente que todas estas modificaciones se encuentren dentro del alcance de la invención que aquí se reivindica.

35

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Therapeutic Human Polyclonals, Inc. Buelow, Roland
- 5 <120> Expresión mejorada de inmunoglobulinas humanas o humanizadas en animales transgénicos no humanos
- <130> 39691-0016.PCT
- <140> No asignado aún
- 10 <141> Adjunto
- <150> 60/841.890
- 15 <151> 2006-09-01
- <160> 12
- <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- 20 <210> 1
- <211> 226
- 25 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1
- 30

```

Met Pro Gly Gly Pro Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Ala Thr Ile Phe
 1      5      10      15
Leu Leu Phe Leu Ser Ala Val Tyr Leu Gly Pro Gly Cys Gln Ala
 20      25      30
Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser Leu Gly Glu
 35      40      45
Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn Ala Asn Val
 50      55      60
Thr Trp Trp Arg Ile Leu His Gly Asn Tyr Thr Trp Pro Pro Glu Phe
 65      70      75      80
Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Gly Thr Leu Ile Ile Gln Asn Val
 85      90      95
Asn Lys Ser His Gly Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Gln Glu Gly Asn
 100     105     110
Glu Ser Tyr Gln Gln Ser Cys Gly Thr Tyr Leu Arg Val Arg Gln Pro
 115     120     125
Pro Pro Arg Pro Phe Leu Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg Ile
 130     135     140
Ile Thr Ala Glu Gly Ile Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro Gly
 145     150     155     160
Thr Leu Leu Leu Phe Arg Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys Leu Gly Leu
 165     170     175
Asp Ala Gly Asp Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn
 180     185     190
Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly
 195     200     205
Thr Tyr Gln Asp Val Gly Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu
 210     215     220
Lys Pro
 225

```

- <210> 2
- <211> 65
- 35 <212> PRT
- <213> Bos taurus

<400> 2

Glu Gln Ala Ser Pro Ile Ala Gly Val Glu Trp Gly Pro Val Thr Val

```

1      5      10      15
Glu Val Arg Leu Thr Gly Thr His Val Gln Ser Ser Ser Val Met Tyr
      20      25      30
Arg Gly Asp Val Gly Ala Gly Glu Lys Pro Thr Arg Met Arg Gln Ser
      35      40      45
Asp Lys Lys Ile Arg Asp Leu Asn Ile Met Phe Ala Ile Gln Asp His
      50      55      60
Ala
65
    
```

5 <210> 3

<211> 66

<212> PRT

10

<213> Mus musculus

<400> 3

```

Leu Glu Ala Arg Leu Leu Tyr Ala Cys Arg Val Glu Gly Gly Pro
1      5      10      15
Thr Asn Glu Arg Leu Thr Glu Asn Gly Arg Pro Ile Phe Ser Gln Ser
      20      25      30
Ile Val Pro Gln Gly Thr Thr Gln Phe Phe Pro Glu Asn Arg Leu Trp
      35      40      45
Gln Ile Asn Asn Ile Leu Lys Arg Asn Val Phe Val Met Pro Asp Asn
      50      55      60
His Ala
65
    
```

15

<210> 4

<211> 66

20

<212> PRT

<213> Canis

<400> 4

25

```

Leu Cys Thr Ile Gly Gly Ser Val Asp Gly Gly Pro Met Thr Thr Arg
1      5      10      15
Leu Leu Arg Arg Leu Ser Ser Lys Leu Ile Val Gln Ala Asp Ile Ser
      20      25      30
Tyr Lys Gly Glu Thr Asp Thr Met Arg Gln Glu Lys Asp Leu Asn
      35      40      45
Gln Lys Ile Leu Ser Ser Glu Arg Leu Asn Met Phe Val Gln Asp His
      50      55      60
Gly Asp
65
    
```

<210> 5

30

<211> 73

<212> PRT

<213> Pan

<400> 5

5

```

Ser Ala Val Arg Glu Trp Pro Ser Pro Gly Pro Tyr Ser His Cys Pro
 1      5      10      15
Ala Gly Asp Thr Arg Phe Ile Phe Glu Val Gly Ile Glu Pro Ile Pro
 20      25      30
Ser Met Trp Val Ser Asn Arg Leu Gly Gln Arg Asp Gly His Ser Pro
 35      40      45
Leu Gln Lys Val Ser Pro Leu Gly Pro Leu Ser Gln Pro Gly Glu Gly
 50      55      60
Leu Gly Arg Gly Thr Pro Asn Ala Gln
 65      70
    
```

<210> 6

<211> 2

10

<212> PRT

<213> Oryctolagus cuniculus

15

<400> 6

```

- - - - -
Asp His
 1
    
```

<210> 7

20

<211> 229

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 7

```

Met Ala Arg Leu Ala Leu Ser Pro Val Pro Ser His Trp Met Val Ala
 1      5      10      15
Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ala Glu Pro Val Pro Ala Ala Arg Ser Glu
 20      25      30
Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser Arg Ile Trp Gln
 35      40      45
Ser Pro Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Arg Phe Thr Val Lys Met His
 50      55      60
Cys Tyr Met Asn Ser Ala Ser Gly Asn Val Ser Trp Leu Trp Lys Gln
 65      70      75
Glu Met Asp Glu Asn Pro Gln Gln Leu Lys Leu Glu Lys Gly Arg Met
 80      85      90      95
Glu Glu Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ala Thr Leu Thr Ile Gln Gly Ile
 100      105      110
Arg Phe Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Lys Cys Asn Asn
 115      120      125
Thr Ser Glu Val Tyr Gln Gly Cys Gly Thr Glu Leu Arg Val Met Gly
 130      135      140
Phe Ser Thr Leu Ala Gln Leu Lys Gln Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly
 145      150      155      160
Ile Ile Met Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro
 165      170      175
Ile Phe Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Glu
 180      185      190
Asp His Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu
 195      200      205
Asp Ile Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly Glu
 210      215      220
His Pro Gly Gln Glu
 225
    
```

<210> 8

5

<211> 51

<212> PRT

<213> Canis

10

<400> 8

```

Gly Val His Asn Leu Val Gly Lys Thr His Gln Asp Thr Gly Gly Ala
 1      5      10      15
Val Glu Ile Arg His Thr Lys Asp Val Ala Arg Leu Glu Lys Pro Pro
      20      25      30
Arg Asp Leu Gln Asp Val Gln Ser Ser Lys Gly Ser Phe Ser Lys
      35      40      45
Arg Asp Asn
      50
    
```

<210> 9

15

<211> 70

<212> PRT

<213> Rattus

20

<400> 9

```

Thr Val Cys Leu Met Phe Gly Met Thr Lys Ser Gln Pro Pro Ile Phe
      1      5      10      15
Gln Pro Lys His Ala Lys Ser Ser Met Phe His Thr Asp Tyr Val Met
      20      25      30
Thr Phe Arg Gln Lys Gly Asn Gln Arg Glu Phe Pro Asp His Ile Ser
      35      40      45
Gln Thr Arg Gly Val Tyr Leu Asn Gln Tyr Ser Thr Glu Pro Asp Thr
      50      55      60
Asp Leu Leu Asp Arg Asn
      65      70
    
```

<210> 10

25

<211> 71

<212> PRT

30

<213> Bos taurus

<400> 10

```

Gly Ser Ile Gly Leu Asn Asn Leu Leu Gly Gly Lys Leu Asp Lys Thr
 1      5      10      15
Asp Leu Leu Asp Asn Thr His Val Lys Gly Ser Glu Ile Arg His Val
      20      25      30
Glu Asp Asp Leu Phe Arg Pro Lys Pro Ser Glu Lys Thr His Ala Gln
      35      40      45
Ile Leu Gln His Lys Glu Val Leu Ser Val Gln Gln Lys Glu Ala Lys
      50      55      60
Gly Gln Arg Thr Glu His Arg
      65      70
    
```

<210> 11

<211> 70

5

<212> PRT

<213> Mus musculus

10

<400> 11

```

Thr Val Ser Met Cys Leu Leu Phe Phe Gly Met Thr Ser Leu Pro Leu
 1          5          10          15
Phe Gln Pro Gln His Ala Lys Ser Ser Met Phe Thr His Ala Leu Thr
          20          25          30
Phe Arg Arg Gly Ser Gln Gln Glu Val Ser Glu Ile Val Gln Thr Gly
          35          40          45
Val Tyr Asn Gln Tyr Lys Asp Ser Ala Asn His Asn Thr Asp Ser Leu
 50          55          60
Leu Asp Arg Leu Gly Asn
65          70
    
```

<210> 12

15

<211> 139

<212> PRT

<213> Gallus

20

<400> 12

```

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

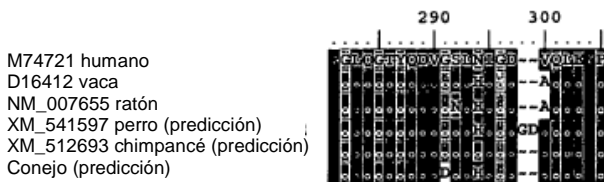
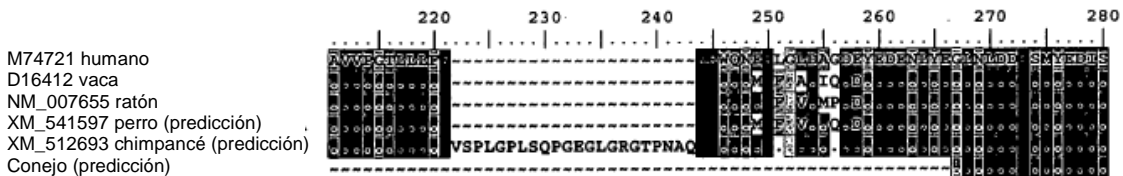
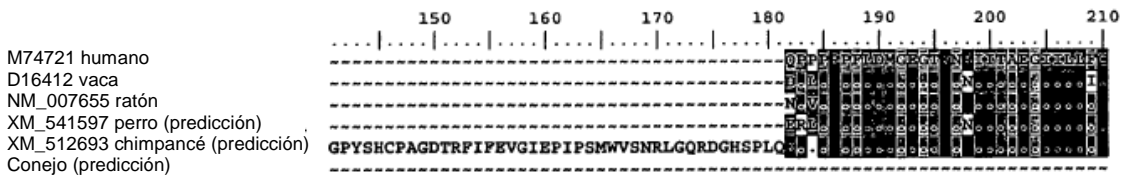
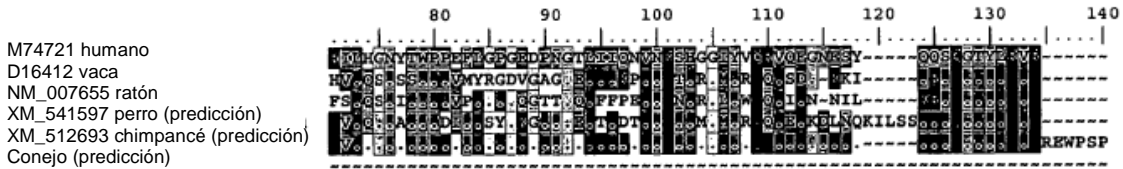
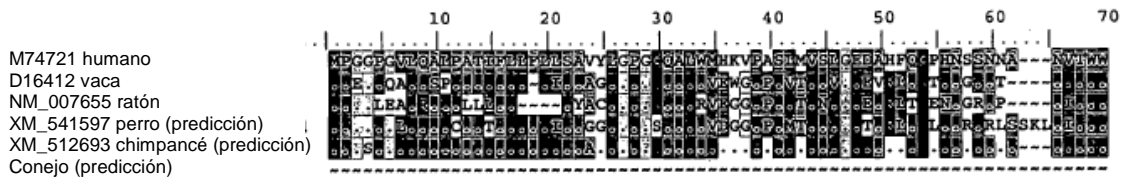
```

          115          120          125
Glu Ile Thr Pro Phe Asp Met Lys Ala Thr Glu
130          135
    
```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un animal transgénico no humano seleccionado de entre el grupo que consiste en primates no humanos, roedores, conejos, cerdos, ovejas, cabras, vacas, caballos y burros, pollos, pavos, patos y gansos que comprende: (a) una construcción transgénica que codifica una subunidad completa de la Ig α humana de Id. de Sec. N $^{\circ}$: 1 y/o, (b) una construcción transgénica que codifica una subunidad completa de la Ig β humana de Id. de Sec. N $^{\circ}$: 7, y, (c) una construcción transgénica que codifica un locus de inmunoglobulina humana; en la que los productos transgénicos resultantes se combinan para formar un complejo receptor de células B humanas.
- 10 2. El animal transgénico no humano de la reivindicación 1 en el que la expresión de cualquier Ig endógena y/o subunidades de la Ig α y/o Ig β del animal transgénico no humano se han reducido sustancialmente.
3. El animal transgénico no humano de la reivindicación 1 o 2 que es un conejo.
- 15 4. Las células B aisladas de dicho animal transgénico no humano de la reivindicación 1, en las que dichas células B expresan la subunidad nativa de la Ig α humana de Id. de Sec. N $^{\circ}$: 1 y/o la subunidad nativa de la Ig β humana de Id. de Sec. N $^{\circ}$: 7, y un locus de inmunoglobulina humana.
- 20 5. Las células B aisladas de la reivindicación 4 en las que dichas células B están inmortalizadas.
6. Las células B aisladas de la reivindicación 4 o 5 en las que dichas células B se han derivado de un conejo.
- 25 7. Un método para obtener anticuerpos humanos en un animal no humano seleccionado de entre el grupo que consiste en primates no humanos, roedores, conejos, cerdos, ovejas, cabras, vacas, caballos y burros, pollos, pavos, patos y gansos que comprende: (a) la introducción y expresión de una construcción transgénica que codifica una subunidad nativa de la Ig α humana de Id. de Sec. N $^{\circ}$: 1, y/o una construcción transgénica que codifica una subunidad nativa de la Ig β humana de Id. de Sec. N $^{\circ}$: 7 en dicho animal no humano y, (b) la introducción y expresión de una construcción transgénica que codifica un locus de una inmunoglobulina humana en dicho animal no humano; (c) someter a dicho animal a un estímulo antigénico; y (d) el aislamiento de anticuerpos humanos a partir de dicho animal.
- 30 8. El método para producir los anticuerpos humanos de la reivindicación 7, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal o monoclonal.
- 35 9. Un método para producir un animal no humano seleccionado de entre el grupo que consiste en primates no humanos, roedores, conejos, cerdos, ovejas, cabras, vacas, caballos y burros, pollos, pavos, patos y gansos que expresan anticuerpos humanos o humanizados que comprenden: (a) la introducción y expresión de una construcción transgénica que codifica una subunidad nativa de la Ig α humana de Id. de Sec. N $^{\circ}$: 1 y/o una construcción transgénica que codifica una subunidad nativa de la Ig β humana de Id. de Sec. N $^{\circ}$: 7 en las células B de dicho animal no humano; y, (b) la introducción y expresión de una construcción transgénica que codifica un locus de una inmunoglobulina humana en dicho animal no humano; en el que los productos transgénicos resultantes se combinan para formar un complejo receptor de las células B humanas.
- 40 10. El método de la reivindicación 9 en el que dicho animal crea una diversidad de anticuerpos por conversión génica y/o hipermutación somática.
- 45 11. El método de la reivindicación 10 en el que dicho animal es un conejo.

ES 2 378 407 T3



(Id. De Sec. Nº 1)
(Id. De Sec. Nº 2)
(Id. De Sec. Nº 3) Figura 1: 1g alfa
(Id. De Sec. Nº 4)
(Id. De Sec. Nº 5)
(Id. De Sec. Nº 6)

ES 2 378 407 T3

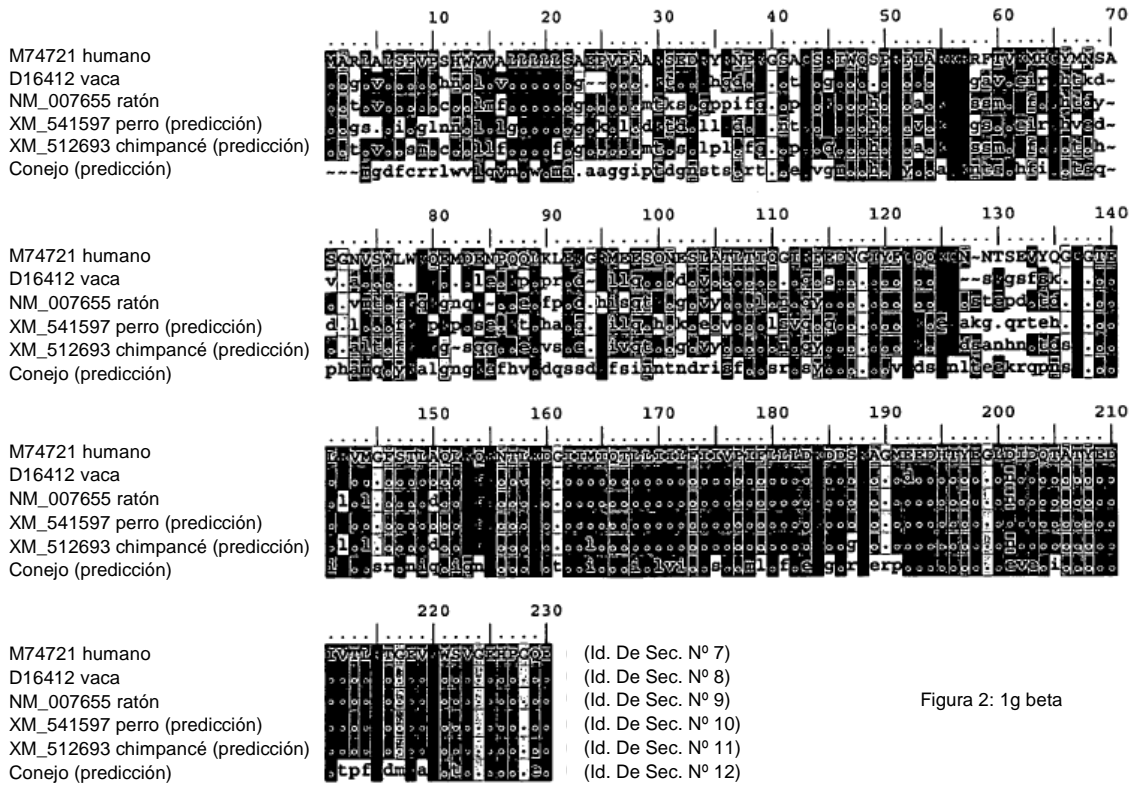


Figura 2: 1g beta