

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 760**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/90** (2006.01)  
**A01K 67/027** (2006.01)  
**C12N 9/02** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08806243 .5**  
96 Fecha de presentación: **12.09.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2209898**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.07.2010**

54 Título: **Deleción de un grupo de genes y humanización en dos etapas**

30 Prioridad:  
**14.09.2007 GB 0718029**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.07.2012**

73 Titular/es:  
**ITI Scotland Limited**  
**Scottish Enterprise Atrium Court 50 Waterloo**  
**Street**  
**Glasgow G2 6HQ, GB**

72 Inventor/es:  
**SCHEER, Nico**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

**ES 2 384 760 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

Deleción de un grupo de genes y humanización en dos etapas

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere, en general, a un procedimiento de humanización de un ratón. En concreto, la invención se refiere a un procedimiento para reemplazar un grupo de genes murinos por un único gen o por múltiples genes del correspondiente grupo de genes humanos mediante el uso de una combinación de recombinación homóloga y recombinación específica de sitio.

**Antecedentes de la invención**

10 Los modelos murinos son una herramienta inestimable para la investigación de enfermedades humanas, y se usan ampliamente para estudiar la evolución de muchas enfermedades y para probar posibles agentes terapéuticos. Convencionalmente, se han producido ratones transgénicos mediante la inyección pronuclear de ADN exógeno. Más recientemente, se han generado ratones mediante la fusión de una célula madre embrionaria (ES) con una célula que contiene un Cromosoma Artificial Bacteriano (CAB) o un Cromosoma Artificial de Levadura (CAL) que comprende el gen exógeno de interés y un marcador seleccionable para evaluar la integración del segmento de ADN exógeno en el

15 genoma de la célula embrionaria, según lo descrito, por ejemplo, en el documento WO94/02602. Dichos procedimientos se basan en la integración del CAB o del CAL en el genoma de la célula madre embrionaria mediante el procedimiento de recombinación homóloga. Debido a las exigencias técnicas del manejo de los CAB y los CAL, y a las bajas velocidades de transfección de las células ES cuando se usan constructos de ADN de gran tamaño, la realización de la transgénesis de esta manera lleva mucho tiempo, y es ineficaz e imprecisa.

20 Wallace *et al.* (*Cell* 128, 197-209 2007) describió recientemente un procedimiento conocido como reemplazo genómico mediado por recombinasa (RMGR). Este procedimiento utiliza la recombinación específica de sitio para reemplazar un alelo murino por un alelo humano del gen ortólogo. Se insertan dos sitios de recombinación específica de sitio no interactivos (*loxP* y *lox511*) en el cromosoma murino que flanquean el gen diana mediante recombinación homóloga. Se inserta un par idéntico de sitios de recombinación específica de sitio no interactivos en un CAB de manera que

25 flanquean el alelo humano del gen diana. La introducción del CAB en la célula murina y la posterior expresión de la recombinasa específica de sitio produce dos reacciones de recombinación específica de sitio entre los sitios de recombinación específica de sitio compatibles del CAB y del cromosoma murino (*loxP/loxP* y *lox511/lox511*), y el intercambio recíproco de la secuencia de genes humanos por la secuencia murina. Sin embargo, este procedimiento contiene múltiples etapas que se deben realizar en una célula madre embrionaria, lo que lleva a deficiencias, en buena parte, debidas a que a menudo se perturba el cariotipo de la célula. Así pues, sigue existiendo la necesidad de un procedimiento racionalizado para humanizar un ratón que, idealmente, requeriría la realización de menos etapas en una célula madre embrionaria y que, por tanto, subsanaría alguno de estos problemas de falta de eficiencia.

30 Además, la invención pretende resolver otro problema del campo de la generación de ratones humanizados. Por ejemplo, los procedimientos anteriormente descritos para generar modelos murinos humanizados se han centrado simplemente en el reemplazo de un único gen murino endógeno por el correspondiente gen humano. Esto es un procedimiento aceptable para aquellos locus de genes en los que un gen murino corresponde a un gen humano. Sin embargo, en la evolución, se pueden desarrollar grupos de genes que, a menudo, sufren repetidos cambios, tales como la duplicación y la diversificación, de manera que el grupo puede variar significativamente entre las diferentes especies. Por lo tanto, en un grupo, a veces no es posible identificar verdaderamente los genes ortólogos entre las

40 especies. En los casos extremos, puede que sólo haya un gen funcional (s) en un grupo de una especie, pero muchos más en otro. Uno de dichos ejemplos es el grupo de genes CYP2D de las enzimas metabólicas, que sólo presenta un gen funcional en seres humanos (CYP2D6), pero nueve genes funcionales en ratones. En dichos casos, el reemplazo de un solo gen murino por el gen humano ortólogo mediante el mecanismo convencional de recombinación homóloga de direccionamiento génico no producirá una humanización funcional debido a la expresión de genes residuales del grupo murino.

45 Además, en muchos casos, el producto génico de un gen puede constituir la funcionalidad principal de todo el grupo (p.ej., CYP3A4 del grupo CYP3A humano o CYP2C9 del grupo CYP2C humano) y podría ser imposible identificar un homólogo funcional de este gen en otras especies. Esto provoca incertidumbre en cuanto a qué gen ha de ser reemplazado y por cuál. A esto, se añade el problema de que, en realidad, puede no ser posible realizar la deleción de un fragmento de ADN de gran tamaño del cromosoma murino, que constituya un grupo de genes entero, en una sola

50 etapa, debido a la falta de eficacia de la recombinación homóloga si los brazos dirigidos están demasiado separados en el cromosoma murino.

55 Un procedimiento de generación de modelos murinos humanizados en el que el locus humanizado refleje correctamente los locus de genes humanos equivalentes de interés permitiría investigar de manera más realista las funciones de los genes codificados en dichos locus y facilitar la investigación en la intervención terapéutica de afecciones que están asociadas con genes que forman parte de los grupos de genes de funcionalidad similar.

En la técnica, se sabe que es posible utilizar recombinasas específicas de sitio para dirigir la recombinación homóloga a ubicaciones cromosómicas específicas (véase Jessen *et al.*, 1997). El uso de dichas recombinasas específicas de sitio permite iniciar la recombinación previa solicitud mediante la adición de la recombinasa específica de sitio.

5 El documento US2007/0061900 describe un procedimiento para humanizar locus de genes de la región variable de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulinas. Este procedimiento implica la inserción en cada uno de dos  
 10 vectores, denominados LTVEC, de un sitio de recombinación específica de sitio en una posición contigua a una parte de la región variable de la inmunoglobulina humana. Luego se alinean estos LTVEC y se introducen en el genoma de una célula murina mediante recombinación homóloga, de manera que los sitios de recombinación específica de sitio  
 15 flanqueen las secuencias de la región variable de la inmunoglobulina murina, y las secuencias parciales de la región variable de inmunoglobulina humana flanqueen los sitios de recombinación específica de sitio. La realización de la recombinación específica de sitio escinde la secuencia de la región variable de la inmunoglobulina murina y une las  
 20 dos secuencias parciales de región variable de inmunoglobulina humana, estando el sitio de recombinación específica de sitio residual contenido en ella. Los ratones resultantes producen anticuerpos híbridos que contienen la región variable humana y la región constante murina, siendo necesarias posteriores etapas de transformación para permitir la  
 25 producción de anticuerpos humanos puros. La naturaleza segmentada de la región variable de la inmunoglobulina permite que el sitio de recombinación específica de sitio residual permanezca en la secuencias de ácidos nucleicos con una escasa probabilidad de sufrir un efecto perjudicial. Sin embargo, no hay indicios de que esta tecnología se  
 30 pueda utilizar para la humanización de genes no segmentados, en los que la presencia de una secuencia de ácidos nucleicos que codifique un sitio de recombinación específica de sitio residual en el gen eliminaría su capacidad de ser transcrito. La solicitud WO2006064197 revela un procedimiento para humanizar un ratón para un grupo de genes de interés que comprende las etapas de dos series dirigidas consecutivas en células ES para incorporar un par de sitios de recombinación específica de sitio en el genoma murino, de modo que la secuencia diana murina que se vaya a reemplazar esté flanqueada a cada lado por un sitio de recombinación con dos tipos de vectores dirigidos. La delección mediada por Cre *in vivo* da como resultado una desactivación del grupo de genes murinos flanqueado por loxP. Se hizo necesaria una etapa más de recombinación mediada por Cre con ADN de CAB que comprendía el gen de reemplazo humano para introducir las secuencias humanas mediante inserción mediada por Cre en células ES rederivadas. Los casetes de selección que flanquean los grupos de genes humanizados se pueden retirar mediante delección mediada por FLP. Por el contrario, el procedimiento de la presente invención permite la completa humanización de cualquier gen o grupo de genes murinos mediante sólo dos series de direccionamiento en células madre embrionarias.

**Resumen de la invención**

Según la presente invención, se proporciona un procedimiento para humanizar un ratón para un gen de interés, que comprende:

- 35 a) incorporar un par de sitios de recombinación específica de sitio en el genoma murino mediante recombinación homóloga, de modo que la secuencia diana de genes murinos que se vaya a reemplazar esté flanqueada a cada lado por un sitio de recombinación;  
 en el que al menos uno de los dos sitios de recombinación se crea de modo que sea contiguo a una secuencia de genes humanos de reemplazo; y dicha secuencia de genes humanos de reemplazo se coloque de manera  
 40 que dicho sitio de recombinación se encuentre entre dicha secuencia de genes humanos de reemplazo y dicha secuencia diana de genes murinos;
- b) realizar la recombinación entre los sitios de recombinación específica de sitio, de modo que la secuencia humana se introduzca en la posición del cromosoma murino anteriormente ocupada por el gen diana murino, flanqueada por el sitio de recombinación específica de sitio residual.

45 En la Figura 1, se muestra un esquema sencillo del mecanismo de la invención. En síntesis, se incorporan dos sitios de recombinación específica de sitio en el cromosoma murino de células madre embrionarias mediante dos reacciones de recombinación homóloga convencionales separadas. La recombinación homóloga es un fenómeno ampliamente conocido en la técnica, aunque para facilitar su comprensión, en la Figura 2, se muestra un esquema del mecanismo de la recombinación homóloga. Las dos reacciones de recombinación son facilitadas por dos regiones de homología entre el cromosoma murino diana y la secuencias de ácidos nucleicos se reemplazo, que comprende el sitio de  
 50 recombinación específica de sitio. Estas regiones de homología facilitan la invasión de las cadenas y el posterior apareamiento de bases, permitiendo el alargamiento de las cadenas que inserta cada sitio de recombinación en el cromosoma murino.

En un lado o ambos lados de la secuencia diana murina, además de a un sitio de recombinación específica de sitio, la secuencia de ácidos nucleicos de reemplazo está ligada a una secuencia de genes humanos que pretende  
 55 reemplazar a la secuencia diana murina. Por lo tanto, en el cromosoma murino, se insertan simultáneamente la secuencia de genes humanos de reemplazo completa y el sitio de recombinación específica de sitio unido, dando como resultado la distribución mostrada en la Figura 1. Una vez completadas ambas reacciones de recombinación, los sitios de recombinación específica de sitio deberían, por tanto, flanquear al gen diana murino. Ambos sitios de recombinación deberían estar alineados en la misma dirección, como se muestra en la Figura 1, para permitir su  
 60 recombinación conjunta de una manera correcta.

Para escindir la secuencia diana de genes murinos y reemplazarla por la secuencia de genes humanos de reemplazo, se efectúa la recombinación específica de sitio entre los dos sitios de recombinación. El mecanismo se representa en la Figura 3. Estas recombinaciones producen la escisión de la secuencia diana de genes murinos, conduciendo a la secuencia de genes humanos de reemplazo situada en el cromosoma murino que estaba previamente ocupado por el gen diana murino, flanqueada por el sitio de recombinación específica de sitio residual formado mediante la recombinación.

El procedimiento de la invención tiene una serie de ventajas. Por un lado, no requiere necesariamente la manipulación de los cromosomas CAB y CAL, y esto facilita significativamente la generación de ratones humanizados, pues se reduce el número de etapas de transformación necesarias en la fase de célula madre embrionaria, siendo incluso menor que en el procedimiento de Wallace descrito anteriormente. En el procedimiento de la invención, se requiere un mínimo de dos series de direccionamiento convencional mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias, en concreto, la incorporación del sitio de recombinación específica de sitio en un lado de la secuencia diana y la incorporación del sitio de recombinación específica de sitio + el o los genes humanos en el otro lado. Entonces, todo lo que se necesita es una sola etapa de delección, en la que se elimina la secuencia diana murina. Esto se puede realizar *in vitro* o *in vivo*. Esta metodología es más eficaz en tanto en cuanto requiere al menos una etapa menos que el procedimiento Wallace, lo que en la práctica habitual se traduce en aproximadamente 8 semanas menos de trabajo en la fase de las células ES, y lo que reduce significativamente el riesgo de acumular interrupciones en las células ES durante múltiples series de transfección que podrían incapacitar a las células para transmitir la línea germinal.

También hay otras ventajas en términos de eficacia en las etapas posteriores de la metodología, pues la humanización de un gen o de un grupo de genes mediante el reemplazo simultáneo del gen o del grupo de genes murinos endógenos según la invención garantiza que el gen humano esté situado en el mismo sitio que el gen murino al que reemplaza. Por consiguiente, cuando se realiza el cruce en busca de homocigosidad, sólo hay un locus que necesita ser reemplazado. Por el contrario, para desactivar un gen murino y reemplazar su función por un gen humano situado en un cromosoma diferente, hay unos antecedentes genéticos mucho más complejos. Para alcanzar la homocigosidad, se necesita un mayor número de cruces, tanto del ratón desactivado como del reemplazo humano.

Una ventaja particular del procedimiento de la invención se refiere a su eficacia. Como resulta evidente gracias al trabajo de Wallace, resulta sumamente ineficaz intentar usar la recombinación mediada por recombinasa para reemplazar un segmento largo de ADN cromosómico por un segmento de tamaño similar en un vector. Se han publicado eficacias del orden de 1 de cada  $10^8$ . Por el contrario, la recombinación intramolecular que se selecciona en el transcurso de la presente invención es habitualmente del orden de 1 de cada  $10^6$ . Además, debido a que las longitudes del ADN usado por Wallace son muy largas (del orden de 200 kb), existe una oportunidad mucho mayor de que se produzcan reorganizaciones intramoleculares y recombinaciones homólogas no deseadas, lo que aumenta la probabilidad de crear una estructura de ADN no funcional o incorrecta. Estos problemas se evitan usando el procedimiento de la presente invención.

El procedimiento tiene como resultado la generación de un ratón que expresa una o varias proteínas humanas en ausencia del gen o de los genes murinos equivalentes; estos se delecionan del cromosoma murino a lo largo de la metodología.

El gen humano introducido se puede incorporar bajo el control de sus propias secuencias reguladoras. Alternativamente, las recombinaciones genéticas se pueden distribuir de manera que las secuencias reguladoras murinas equivalentes estén situadas secuencia arriba de la secuencia humana y, por tanto, se usen en su lugar. A veces, se deseará conservar las secuencias reguladoras murinas en lugar de incorporar las supuestas secuencias reguladoras humanas con la secuencia de codificación del gen. Por ejemplo, en el caso de CYP3A4, se ha creado un ratón humanizado que porta el promotor humano, y la actividad de éste rige la regulación del gen CYP3A4. Sin embargo, Cheung *et al* (*Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316, 1328-1334 2006) demuestran que, con esta distribución, la proteína CYP3A4 no se expresa en machos adultos. Así pues, se supone que debe existir algún elemento promotor u otro factor que falta en el constructo usado. Por el contrario, mediante la conservación de las secuencias reguladoras murinas y el uso de éstas para la regulación en lugar de las secuencias humanas, es posible garantizar la conservación de una fiel regulación del gen introducido y la subsanación de dichos problemas.

Una ventaja del procedimiento de la invención frente a las técnicas convencionales, en las que la integración de los genes humanos en el cromosoma murino es más o menos aleatoria, es que la integración en el sitio de los genes murinos equivalentes garantiza la conservación del contexto genómico de la colocación de los genes. Mediante la integración en dicho sitio, es probable que la estructura cromosómica local sea "abierta" en el sentido en que es posible el acceso al ADN cromosómico para los factores de transcripción y otras proteínas necesarias para que la transcripción tenga lugar. No sólo esto, sino que se conserva el mismo contexto cromosómico en cuanto al gen murino endógeno, de manera que se conserva la regulación de la transcripción del ADN a nivel de la estructura terciaria del cromosoma, por medio de la unión a la histidina y el plegamiento/desplegamiento local del cromosoma. Esto garantiza el mantenimiento de una regulación holística de la transcripción génica, de modo que se sigue la misma distribución de los tejidos de la regulación génica para el gen humano introducido que la observada para el gen murino endógeno. Esta conservación total de los mecanismos de regulación fisiológicos al nivel de la transcripción génica no es común a las técnicas anteriores.

Otra ventaja de la metodología se refiere al problema de la letalidad generado por la delección de un gen o grupo de genes importantes, especialmente, si existe una insuficiencia haploide con respecto al gen o al grupo de genes deleccionado, lo que es letal en animales heterocigóticos. Debido a que la metodología de la invención delecciona simultáneamente el/los gen/es murino/s y lo/s reemplaza por su equivalente funcional humano, no hay tiempo cuando se ve comprometida la función codificada por el gen. Por consiguiente, siempre y cuando la función de la proteína humana no reemplace la de la proteína murina equivalente, se evitan los problemas de esta naturaleza.

La invención también permite la formación de un gen humano funcional mediante la combinación de dos mitades que se introducen en cada lado de un gen o grupo de genes murino del cromosoma. Tras la recombinación específica de sitio para escindir el gen o grupo de genes murinos, las mitades que componen el gen humano se unen para formar un gen humano funcional. El posible problema del sitio RT residual que interrumpe la secuencia de codificación se puede resolver mediante la colocación de este sitio RT en un intrón. De igual manera, la invención permite la combinación de diferentes genes que habitualmente no están colocados de manera contigua en un cromosoma humano. Por supuesto, esta estrategia no podría funcionar con el uso de técnicas anteriores, tales como la de Wallace, en la que los componentes que se van a combinar podrían estar en cromosomas diferentes o muy separados para ser abarcados por un solo CAB o CAL.

El enfoque descrito en la presente memoria se puede utilizar de manera particularmente ventajosa en los casos en los que una determinada funcionalidad murina y humana esté codificada por una serie de diferentes genes ligados contiguamente en el cromosoma de un grupo. El procedimiento permite la simple sustitución del grupo de genes murinos con el gen o grupo de genes humanos equivalente. De manera similar, y por las mismas razones, el procedimiento de la invención está bien adaptado a la humanización de un sistema genético murino que contenga un alto nivel de redundancia a nivel genético. Por ejemplo, cuando es posible controlar la función de un gen murino, total o parcialmente, por otro gen murino del mismo grupo de genes en ausencia del primer gen elegido, es importante, al realizar la humanización, garantizar que todos los genes sean reemplazados por el/los equivalente/s humano/s; si esto no es así, la lectura del sistema humanizado será confusa y, en última instancia, carecerá de significado.

#### **Breve descripción de las figuras**

**Figura 1. Esquema de la metodología de la invención.** El procedimiento proporciona un mecanismo de humanización que comprende la inserción de dos pares de sitios de recombinación específica de sitio, uno de los cuales se dispone de manera que sea contiguo a una secuencia de genes humanos de reemplazo, mediante recombinación homóloga, y la realización de una recombinación específica de sitio entre el primer par de sitios para escindir el gen diana murino. La realización de la recombinación a través del segundo par de sitios de recombinación específica de sitio escinde la secuencia de genes humanos de reemplazo, creando un gen desactivado.

**Figura 2. Mecanismo de recombinación homóloga.** La recombinación homóloga se produce tras una rotura del cromosoma de cadena doble. La actividad exonucleasa 5' a 3' produce un saliente 3' y permite que se produzca la invasión de las cadenas. La síntesis del ADN utiliza la cadena intacta como molde y la unión repara la rotura cromosómica generando una unión de Holliday. La posterior migración de las ramas y la resolución generan los productos recombinantes.

**Figura 3. A) Sitio de recombinación específica de sitio LoxP. B) Mecanismo de recombinación específica de sitio.** Se alinean dos sitios LoxP mediante un apareamiento de bases complementarias, lo que permite a la recombinasa Cre catalizar la recombinación entre los 2 sitios, escindiendo así el gen diana murino.

**Figura 4. Principios de la invención si se va a controlar la expresión del gen humano mediante un promotor murino en la que A) un promotor murino adecuado se orienta hacia el interior por un lado del grupo de genes murinos o B) un promotor murino adecuado se orienta hacia el exterior por un lado del grupo de genes murino. A)** Se inserta la secuencia de genes humanos de reemplazo entre el promotor murino y el gen diana murino, lo que permite que el promotor murino se mantenga y controle la expresión desde la secuencia de genes humanos de reemplazo. **B)** La estrategia no es aplicable al procedimiento de la invención. Por lo tanto, y además debido a que no hay un promotor adecuado necesariamente ubicado en el extremo del grupo de genes murinos, el uso de promotores humanos, según lo representado en las siguientes figuras, o incluso la reintroducción de promotores murinos, se puede aplicar de una manera mucho más universal.

**Figura 5. Principios de la invención si la expresión del gen humano se va a controlar mediante un promotor humano, en la que A) la expresión del gen murino en el extremo del grupo de genes se orienta hacia el exterior; B) la expresión del gen murino en el extremo del grupo de genes se orienta hacia el interior y se define el promotor de este gen; o C) la expresión del gen murino en el extremo del grupo de genes se orienta hacia el interior y no está definido el promotor de este gen. A)** Se inserta la secuencia de genes humanos de reemplazo en el genoma murino secuencia arriba del gen murino y del promotor murino. La posterior recombinación mediada por Cre conducirá a la delección física del/de los gen/es murino/s en el extremo del grupo de genes, incluyendo las secuencias promotoras. Esta estrategia se seleccionó en un extremo del grupo de genes Cyp3a tanto en el caso de CYP3A4 en Cyp3a11 (Figura 11) como en el de CYP3A4 en Cyp3a25 (Figura 7), y en un extremo del grupo Cyp2d, en el caso de la humanización de CYP2D (Figura 9). **B)**

La secuencia de genes humanos de reemplazo se inserta en el genoma murino secuencia arriba del gen murino y del promotor murino. La posterior recombinación mediada por Cre conducirá a la delección física del/de los gen/es murino/s en el extremo del grupo de genes que incluye las secuencias promotoras. Sin embargo, la longitud de un promotor murino, habitualmente, no está bien definida, por tanto, esta estrategia no debería usarse en el procedimiento de la presente invención. **C)** La secuencia de genes humanos de reemplazo se inserta en el genoma murino entre el promotor murino y el gen murino. La recombinación mediada por Cre dejará, por tanto, al promotor murino intacto. Para evitar la interferencia con el casete de expresión humano, una secuencia receptora de cortes y empalmes poly(A) (sApA) termina la transcripción del ARNm. La secuencia sApA puede estar ubicada en el intrón 1 en el caso del gen murino o en cualquier intrón secuencia abajo. Si la recombinación homóloga tiene lugar en un exón del gen murino, basta únicamente con una señal de poly(A) (sin sitio aceptor de cortes y empalmes) para terminar la transcripción. Esta estrategia fue seleccionada en el otro extremo del grupo Cyp3a, tanto en el caso de CYP3A4 en Cyp3a11 (Figura 11) como en el caso de CYP3A4 en Cyp3a25 (Figura 7), y en el otro extremo del grupo Cyp2d, en el caso de la humanización de CYP2D (Figura 9) y en ambos extremos del grupo Cyp2c, en el caso de CYP2C9 en Cyp2c55 (Figura 8). Cabe señalar que se debería hacer la misma consideración mostrada en A), B) y C) para un extremo del grupo de genes murinos (mostrado en la figura, en el lado izquierdo) para el otro extremo del grupo.

**Figura 6. Procedimiento de generación de un ratón transgénico.** Se produce un ratón transgénico mediante la inserción de una o más células madre embrionarias modificadas en un blastocisto en desarrollo. Entonces se implanta el blastocisto en un ratón pseudo-preñado y se deja que se desarrolle, produciendo una quimera. El cruce de la quimera con una cepa delecionadora genera la escisión del gen diana murino y produce ratones que son heterocigóticos para el gen humanizado. El cruce de dos de dichos heterocigotos produce ratones homocigóticos para la humanización.

**Figura 7. Procedimiento para la humanización de CYP3A4 usando el correspondiente promotor humano.** Una estrategia diana para la generación de ratones humanizados para CYP3A4, en la que se deleciona el grupo murino CYP3A y, posteriormente, es posible desactivar el casete de expresión humano.

**Figura 8. Procedimiento para la humanización de CYP2C9 usando el correspondiente promotor humano.** Una estrategia diana para la generación de ratones humanizados para CYP2C9, en la que se deleciona el grupo murino CYP2C y, posteriormente, es posible desactivar el casete de expresión humano.

**Figura 9. Procedimiento para la humanización de CYP2D6 usando el correspondiente promotor humano.** Una estrategia diana para la generación de ratones humanizados para CYP2D6, en la que se deleciona el grupo CYP2D y, posteriormente, es posible desactivar el casete de expresión humano.

**Figura 10. El análisis de PCR demuestra la correcta generación de un ratón humanizado CYP2D6 heterocigótico.** El uso de cebadores específicos permite el análisis del cromosoma murino mediante PCR. A): los resultados demuestran la correcta introducción de la secuencia de genes humanos CYP2D de reemplazo deseada y la delección del grupo de genes murino CYP2D para generar un ratón humanizado heterocigótico para CYP2D6. B) Confirmación mediante PCR de ratones humanizados CYP2D6 homocigóticos. Los ratones con los ID 224504, 225938, 225939 y 225944 están homocigóticamente humanizados para CYP2D6 y portan una delección del grupo de genes murinos Cyp2d. C): expresión de la proteína CYP2D6 en hígado murino huCYP2D6. Se cargaron en un gel para electroforesis de poliacrilamida-Un al 10% 1ug de microsomas de riñón de ratón (MLM) huCYP2D6 macho (n = 1) junto con microsomas renales humanos (HLM) (n = 20) y murinos (n = 20) de tipo natural mezclados (ambos sexos). Se incubaron las membranas con un anticuerpo CYP2D6 murino monoclonal específico de seres humanos (1:2000, Gentest) y conjugado de HRP anti-ratón (1:2000, GE Healthcare). Desarrollo de ECL con una exposición de 30 s. Los patrones cargados fueron los siguientes: 1: Cyp2d22 recombinante murino marcado con His (0,01 pmol, CXR Biosciences). 2: baculosomas CYP2D6 humanos (0,01 pmol, Invitrogen); 3: Cyp3a11 recombinante murino marcado con His (0,1 pmol, CXR Biosciences); 4: baculosomas CYP3A4 humanos (0,1 pmol, Invitrogen); 5: Cyp2c29 recombinante murino marcado con His (0,1 pmol CXR Biosciences); 6: baculosomas CYP2C9 humanos (0,5 pmol).

**Figura 11. Procedimiento para la humanización de huCYP3A4 usando el promotor Cyp3a11 murino.** Una estrategia diana para la generación de ratones humanizados para CYP3A4 usando el promotor Cyp3a11, en la que se deleciona el grupo de genes murinos CYP3A.

**Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

La presente invención proporciona un procedimiento para humanizar un ratón para un gen de interés que comprende:

- a) incorporar un par de sitios de recombinación específica de sitio en el cromosoma murino mediante recombinación homóloga, de modo que la secuencia diana de genes murinos que se vaya a reemplazar esté flanqueada a cada lado por un sitio de recombinación; en el que al menos uno de los dos sitios de recombinación se crea para que sea contiguo a una secuencia de genes humanos de reemplazo; y dicha secuencia de genes humanos de reemplazo está colocada de manera

que dicho sitio de recombinación se encuentra entre dicha secuencia de genes humanos de reemplazo y dicha secuencia de genes murinos diana;

5 b) realizar la recombinación entre los sitios de recombinación específica de sitio, de modo que la secuencia humana se introduzca en la posición del cromosoma murino anteriormente ocupada por el gen diana murino, flanqueada por el sitio de recombinación específica de sitio residual.

Los términos "humanizar" e "humanizado/a", como se usan en la presente memoria, se refieren a la introducción de uno o varios genes humanos en el genoma de un ratón, en el lugar del gen o de los genes murinos endógenos. Los términos se pueden usar para describir el efecto de dicho reemplazo génico en un cromosoma, una célula, un tejido, un órgano o un organismo murino.

10 **Metodología**

Según la presente invención, los genes humanos de reemplazo que se introducen en el modelo transgénico se insertan, preferentemente, en el punto del cromosoma en el que el gen o el grupo de genes equivalentes endógenos se encuentran de manera natural. Esto tiene la ventaja de que se conserva el contexto del locus génico, lo que significa que la fidelidad de la transcripción desde este sitio es lo más cercana posible al nivel de transcripción que tiene lugar en el sistema de tipo natural.

15 Las etapas de recombinación se realizan preferentemente en una célula madre embrionaria murina según procedimientos ampliamente conocidos en la técnica y tratados más adelante. Las células madre embrionarias se cultivan en líneas celulares de células totipotentes, en las que las células, cuando se introducen en un embrión temprano, se desarrollarán para poblar todos los tejidos del organismo en desarrollo.

20 La primera etapa del procedimiento es la incorporación de un par de sitios de recombinación específica de sitio en el cromosoma murino, también denominados sitios diana para la recombinasa o sitios RT. Los sitios RT son reconocidos por las recombinasas específicas de sitio (SSR). La exposición a la actividad de la enzima SSR produce una redistribución del ADN determinada por la disposición de los sitios RT, que en una molécula de ADN lineal da como resultado la escisión o el corte de la secuencia intermedia.

25 La secuencia de genes murinos diana que se va a reemplazar ha de estar flanqueada a cada lado por un sitio RT. La recombinación entre los dos sitios RT cortará, por tanto, la secuencia intermedia.

Uno o ambos sitios de recombinación están diseñados para que sean contiguos a la secuencia de genes humanos de reemplazo. La secuencia humana ha de estar colocada de manera que el sitio de recombinación se encuentre entre la secuencia de genes humanos de reemplazo y la secuencia de genes murinos diana que va a ser reemplazada. Esto tiene el efecto de que cuando se produce la recombinación entre los dos sitios RT, es decir, el corte de la secuencia diana murina, la secuencia humana se introduce en la posición previamente ocupada por el gen diana murino del cromosoma murino. Permanecerá un sitio de recombinación específica de sitio residual en el punto en el que la secuencia diana murina residía anteriormente. Ventajosamente, la integración se diseña de modo que el sitio RT residual no interrumpa la secuencia codificante del gen introducido ni influya negativamente en la transcripción desde el promotor que la dirija. Esto se puede lograr colocando con cuidado los sitios RT de manera que no perturben la secuencia codificante o mediante la colocación de los sitios RT en intrones.

30 En una realización de la invención, se puede usar más de una secuencia de genes humanos de reemplazo, de modo que se coloque una secuencia de genes humanos de reemplazo tanto secuencia arriba como secuencia abajo de la secuencia de genes murinos diana. De esta manera, tras la recombinación específica de sitio, se escinde la secuencia diana murina y se unen en su sitio las secuencias humanas de reemplazo.

Hay una serie de casos en los que dicha estrategia podría resultar ventajosa. Por ejemplo, dadas las limitaciones relativas al tamaño de las técnicas de recombinación homóloga existentes, podría ser necesario incorporar dos secuencias humanas de reemplazo flanqueantes separadas para introducir la cantidad de secuencia de reemplazo deseada. Por ejemplo, se podría introducir CYP1A1 secuencia arriba del equivalente murino endógeno, mientras que CYP1A2 se podría introducir secuencia abajo.

45 También podría ser apropiado introducir dos genes separados de esta manera, quizás dos genes que estén muy separados en un grupo de genes, de manera que no sean abarcados por un solo CAB o CAL, o dos genes que estén ubicados en diferentes cromosomas. Dicha estrategia no se podría llevar a la práctica mediante el uso de los sistemas de la técnica anterior.

50 La invención también permite la formación de un gen humano funcional mediante la combinación de dos mitades que se introducen a cada lado de un gen o grupo de genes murinos en el cromosoma. Tras la recombinación específica de sitio para escindir el gen o grupo de genes murinos, las mitades que componen el gen humano se unen para formar un gen humano funcional. Mediante este procedimiento, se podría conseguir una activación específica del tiempo o de un tejido del gen humano y una desactivación del/de los gene/s murino/s. El posible problema del sitio RT residual que interrumpe la secuencia de codificación se puede resolver mediante la colocación de este sitio RT en un intrón.

- Los procedimientos para incorporar los sitios RT en el cromosoma serán conocidos por los expertos en la técnica, y se realizan preferentemente aprovechando el procedimiento de recombinación homóloga. La recombinación homóloga se refiere al mecanismo genético del que se puede hacer uso para permitir la inserción de una secuencia de ácidos nucleicos en el cromosoma murino. El mecanismo se inicia mediante la alineación de las secuencias de ácidos nucleicos murina y humana bicatenarias. Una rotura de la cadena doble de la secuencia murina y la actividad exonucleasa 5' a 3' facilitan la invasión de las cadenas, dando como resultado el apareamiento de las secuencias humana y murina homólogas a través de las regiones cortas de homología. El posterior alargamiento de las cadenas de la secuencia murina utiliza la secuencia humana como molde, y la resolución produce la secuencia genómica murina con la secuencia humana ubicada en ella, mientras que la secuencia humana permanece intacta.
- Los procedimientos para realizar la recombinación homóloga son conocidos en la técnica y hacen uso de las regiones de homología entre las moléculas de ADN suministradas exógenamente y el cromosoma diana para introducir los sitios RT. Los ejemplos de sistemas de administración dirigida adecuados serán obvios para los expertos en la técnica, e incluyen el uso de ADN desnudo inyectado o dirigido, liposomas dirigidos que encapsulan y/o forman un complejo con el ADN, sistemas retrovirales dirigidos y ADN condensado dirigido, tal como protamina y ADN condensado con polilisina, o electroporación. También se pueden emplear otros procedimientos de administración, tales como, el uso de vectores de expresión de ácidos nucleicos (véase Curiel (1992) *Hum Gene Ther* 3:147-154; Wu (1989) *J Biol Chem* 264: 16985-16987) y el uso de una pistola de partículas de transferencia génica (descrito en el documento US 5.149.655). También se puede emplear ADN desnudo, como se describe detalladamente en la solicitud de patente internacional WO 90/11092.
- El par de RT se selecciona preferentemente del grupo que consiste en LoxP, FRT, attP/attB y rox (Sauer y McDermott, *Nucleic Acids Res.* 32(20): 6086-95, 2004). Esta lista se proporciona únicamente a modo de ejemplo y no pretende ser restrictiva. En este aspecto, la recombinación entre dichos pares de sitios de recombinación específica de sitio se efectuará mediante la correspondiente recombinasa específica de sitio, i.e. Cre, FLP, PhiC31 y Dre, respectivamente. Se entenderá que dicha recombinación específica de sitio se puede realizar *in vivo* o *in vitro*.
- Como cuestión práctica, cada sitio RT ha de ser creado para que esté ligado y, preferentemente, sea contiguo a un marcador seleccionable. La inclusión de un marcador seleccionable permite la detección del sitio RT en el cromosoma murino y, como tal, permite el seguimiento de la correcta inserción del par de sitios RT.
- Cada marcador seleccionable se coloca preferentemente de manera que ocupe el espacio entre la secuencia diana murina y el sitio RT. Esto significa que tras una recombinación correcta, se eliminan los marcadores seleccionables del cromosoma y, por tanto, dejan de formar parte de la metodología. De este modo, es posible asegurarse de que el marcador seleccionable no tenga un efecto perturbador en la regulación de la secuencia humana que permanece en el cromosoma tras la humanización.
- Todos los marcadores seleccionables son preferentemente diferentes entre sí. Esto permite el seguimiento de la inserción de cada sitio de recombinación por separado y de manera independiente.
- Los marcadores seleccionables son, preferentemente, genes que codifican el mismo tipo de resistencia a un compuesto químico al que las células ES en crecimiento se pueden exponer, tal como un antibiótico. Los ejemplos incluyen el uso de marcadores seleccionables que confieren resistencia a antibióticos añadidos al medio de crecimiento de las células, por ejemplo, el marcador de la resistencia a la neomicina, que confiere resistencia a G418, la higromicina o la puomicina. Otros ejemplos implican la detección con el uso de secuencias de ácidos nucleicos que sean complementarias y que se hibriden con, o un componente de, la secuencia de ácido nucleico según los aspectos anteriores de la invención. Los ejemplos incluirían el análisis de transferencia *Southern*, el análisis de transferencia *Northern* y la PCR.
- Una estrategia preferida implica la creación de células madre embrionarias murinas modificadas, preferentemente, en etapas separadas, mediante las cuales se incorpora un sitio RT por separado con su marcador seleccionable. La célula madre embrionaria modificada se puede insertar posteriormente en un blastocisto. Convencionalmente, los blastocistos se aíslan de un ratón hembra aproximadamente 3 días después de su apareamiento. Se entenderá que es posible insertar simultáneamente hasta 20 células madre embrionarias modificadas en dicho blastocisto, preferentemente, aproximadamente 16. Mediante la inserción de las células madre embrionarias modificadas en el blastocisto, la célula madre embrionaria se incorporará en el embrión temprano en desarrollo, preferentemente, mediante su trasplante en un ratón pseudo-preñado que haya sido inducido para reflejar las características del ratón preñado. Según la presente metodología, el blastocisto, que contiene la célula madre embrionaria modificada, se implantará en la pared uterina del ratón pseudo-preñado y continuará desarrollándose en el ratón hasta que se complete la gestación. La célula madre embrionaria modificada proliferará y se dividirá para poblar todos los tejidos del ratón transgénico en desarrollo, incluyendo su línea germinal.
- En un aspecto de la metodología, el ratón transgénico creado puede ser una quimera que contenga las células modificadas y no modificadas en cada tejido somático y en la línea germinal.

Para efectuar la recombinación entre los sitios RT, se debe exponer el genoma a la actividad SSR en forma de una enzima SSR. El término "SSR" se refiere a cualquier componente proteico de cualquier sistema recombinante que



5 medie las redistribuciones del ADN en un locus de ADN específico, incluyendo las SSR de las clases integrasa o resolvasa/invertasa (Abremski, K.E. y Hoess, R.H. (1992) *Protein Engineering* 5, 87-91; Khan, *et al.*, (1991) *Nucleic acids Res.* 19, 851-860; Nunes-Duby *et al.*, (1998) *Nucleic Acids Res* 26 391-406; Thorpe y Smith, (1998) P.N.A.S EE.UU. 95 5505-10) y la recombinación específica de sitio mediada por endonucleasas codificadas por intrones (Perrin *et al.*, (1993) *EMBO J.* 12, 2939-2947).

10 Las proteínas recombinasas preferidas se seleccionan del grupo que consiste en: recombinasa FLP, recombinasa Cre, recombinasa Dre, recombinasa R del plásmido pSR1 de *Zygosaccharomyces rouxii*, una recombinasa del plásmido pKD1 de *Kluyveromyces drosophilium*, una recombinasa del plásmido pKW1 de *Kluyveromyces waltii*, Trp1 del transposón de bacilo Tn4430, cualquier componente del sistema de recombinación  $\lambda$  Int, phiC31, cualquier componente del sistema de recombinación Gin y sus variantes.

15 La metodología para mediar las deleciones mediadas por Cre/lox, adecuadas para la delección de grandes fragmentos de ADN (200 kb a varias megabases) se ha descrito en los siguientes documentos ( Li ZW, Stark G, Gotz J, Rulicke T, Gschwind M, Huber G, Muller U, Weissmann C. "Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells", *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 1 de junio de 1996; 93(12):6158-62. Errata en: *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 15 de octubre de 1996; 93(21):12052; en Su H, Wang X, Bradley A. "Nested chromosomal deletions induced with retroviral vectors in mice". *Nat Genet.*, enero de 2000; 24(1):92-5); Call LM, Moore CS, Stetten G, Gearhart JD. "A cre-lox recombination system for the targeted integration of circular yeast artificial chromosomes into embryonic stem cells". *Hum Mol Genet.*, 22 de junio de 2000; 9(12): 1745-51).

20 Como se menciona anteriormente, la recombinación específica de sitio puede efectuarse *in vitro* o *in vivo*. La recombinación específica de sitio se puede efectuar induciendo la actividad de la SSR en el ratón transgénico. De hecho, un uso correcto de la recombinación específica de sitio para modificar el genotipo de sistemas vivos requiere estrategias que regulen la recombinación. Esto se puede hacer mediante el control de la expresión del ARNm de la recombinasa o la proteína (Baubonis y Sauer (1993) *Nucl Acids Res.* 21, 2025-2029; Sauer B, (1994) *Curr Opin Biotechnol* 5: 521-7; Rajewsky *et al.*, (1996) *J Clin Invest* 98, 600-3; Metzger y Feil, (1999) *Curr. Opinions Biotechnology* 10, 470-476), de modo que el patrón de expresión alcanzado se restrinja a los tiempos y lugares en los que estos elementos específicos de tejidos sean activos.

30 Los investigadores han usado la transfección directa, la infección con virus recombinantes o la inyección del ADN o ARNm codificante de la proteína SSR o la propia proteína (Konsolaki *et al.*, (1992) *New Biol.* 4: 551-557) para expresar enzimas SSR. Se puede conseguir un grado más preciso de control mediante la regulación de la actividad, en lugar de la expresión de estas enzimas SSR. Una estrategia usa proteínas de fusión en las que se fusiona la enzima SSR con el dominio de unión a ligandos (LBD) de un receptor esteroideo para dar una proteína SSR-LBD (véase el documento EP-B-0 707 599; también Logie y Stewart (1995) P.N.A.S. EE.UU. 92: 5940-5944; Brocard *et al.*, (1997) P.N.A.S. EE.UU. 94: 14559-14563; Akagi *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res* 25, 1766-73). Esta estrategia se basa en la aplicación de un ligando para el receptor esteroideo que activa la actividad SSR sólo cuando el ligando se une al resto receptor. El LBD del receptor inhibe la actividad de SSR en ausencia de un ligando afín. La administración del ligando afín libera la inhibición de SSR, permitiendo así la recombinación entre los sitios RT.

40 Por tanto, es posible efectuar la inducción provocando la transcripción de dicha SSR, la traducción de la SSR o la eliminación de un inhibidor de la SSR. Alternativamente, es posible introducir artificialmente una SSR en dicho ratón transgénico. Un elemento de la metodología es que es posible efectuar una recombinación específica de sitio en el ratón transgénico, dando como resultado la escisión del gen diana murino y la producción concomitante de un ratón humanizado.

45 Preferentemente, la recombinación específica de sitio se puede efectuar cruzando el ratón transgénico con un ratón de una cepa delecionadora. La expresión "cepa delecionadora", como se usa en la presente memoria, se refiere a un ratón que expresa la recombinasa específica de sitio en la línea germinal, que se puede cruzar con un ratón transgénico para efectuar la escisión de la secuencia diana de genes murinos. De esta manera, la recombinación *in vivo* produce descendencia heterocigótica para el gen de interés. El cruce del ratón transgénico con una cepa delecionadora producirá, por tanto, una progenie que tendrá células que contendrán el cromosoma murino modificado para que contenga la secuencia de genes humanos de reemplazo y la recombinasa específica de sitio, dando como resultado la escisión el gen diana murino y la humanización funcional de las células. Dicho ratón transgénico será, por tanto, heterocigótico para la humanización del gen o del grupo de genes específicos. En otro aspecto más de la metodología, la recombinasa específica de sitio sólo se puede expresar en un cierto tejido del ratón de la cepa de la recombinasa. Se sabe en la técnica que la delección de ciertos genes o grupos de genes puede ser letal o puede tener efectos fenotípicos subletales. Además, el reemplazo de dichos genes por sus equivalentes humanos puede que no evite la letalidad. En estas circunstancias, puede ser posible subsanar cualquiera de dichos problemas de letalidad mediante la expresión de la recombinasa específica de sitio únicamente en ciertos tejidos. Esto será particularmente ventajoso, si se sabe que un gen específico es esencial en un determinado tejido, pues la expresión de la recombinasa específica de sitio de esta manera permite que el gen murino perdure en esos tejidos.

60 En este aspecto de la invención, la SSR puede ser albúmina-Cre. La albúmina-Cre es una variante específica de la SSR Cre que actúa en el sitio RT LoxP. La Albúmina-Cre se expresa únicamente en el hígado y, por tanto, permitirá

que la secuencia diana murina perdure en todos los tejidos a excepción del hígado, subsanando los posibles problemas de letalidad, a la vez que proporciona un hígado funcionalmente humanizado.

5 En última instancia, es posible cruzar dos ratones heterocigóticos producidos según la metodología anterior para producir un ratón transgénico que sea homocigótico para el alelo humano del gen o de los genes de interés. El cruce de dos ratones transgénicos heterocigóticos producirá una proporción de la progenie que será homocigótica para la humanización.

En una realización más de la invención, el animal no humano transgénico se produce *de novo*, para incluir todas las características anteriormente mencionadas, mediante los procedimientos revelados de aquí en adelante.

10 También es posible realizar la recombinación específica de sitio en una célula somática que luego se pueda usar como célula donante de transferencia nuclear con el fin de crear una colonia de ratones clonados según la metodología del documento WO00/51424 o una variación del mismo.

15 En realizaciones de la revelación que se refieren a la preparación de una célula huésped transgénica o un animal no humano transgénico que comprende el uso de un constructo de ácido nucleico según lo descrito previamente, es posible someter la célula o el animal no humano a una mayor transgénesis, siendo la transgénesis la introducción de un gen o varios genes, o una secuencia o varias secuencias adicionales de ácidos nucleicos que codifican la proteína. La transgénesis puede ser una transfección transitoria o estable de una célula o línea celular, un sistema de expresión episomal de una célula o línea celular, o la preparación de un animal no humano transgénico mediante microinyección pronuclear, mediante recombinaciones en células madre no embrionarias (ES), transgénesis aleatoria en células madre embrionarias (ES) no humanas o mediante la transfección de una célula cuyo núcleo se use como un núcleo donante en un procedimiento de clonación de transferencia nuclear.

20 Los procedimientos de preparación de una célula o línea celular transgénica, o un animal no humano transgénico comprenden la transfección transitoria o estable de una célula o de una línea celular, la expresión de un sistema de expresión episomal en una célula o línea celular, o la microinyección pronuclear, recombinaciones en células ES u otra línea celular, o mediante transfección de una línea celular que se puede diferenciar en diferentes rutas evolutivas y cuyo núcleo se va a usar como donante para la transferencia nuclear; en el que se usa la expresión de una secuencia o constructo de ácido nucleico adicional para rastrear la transfección o la transgénesis según los aspectos previos de la invención. Otros ejemplos incluyen el uso de marcadores seleccionables que aportan resistencia a antibióticos añadidos al medio de crecimiento de las células, por ejemplo, el marcador de resistencia a la neomicina que aporta resistencia a G418. Otros ejemplos implican la detección mediante el uso de secuencias de ácidos nucleicos que sean complementarias y que se hibriden con, o un componente de, la secuencia de ácido nucleico según los aspectos previos de la invención. Los ejemplos incluirían el análisis de transferencia Southern, el análisis de transferencia Northern y la PCR.

#### **Secuencia de genes humanos de reemplazo**

35 La invención se puede poner en marcha mediante el uso de uno cualquiera de una serie de genes, como será evidente para los expertos en la técnica. No existen restricciones técnicas en cuanto al tipo de gen que se puede intercambiar entre la diana murina y el sustituyente humano. Sin embargo, la propia invención conduce particularmente a sistemas genéticos en los que la funcionalidad murina esté codificada por una serie de diferentes genes ligados contiguamente en el cromosoma de un grupo. El procedimiento permite el simple reemplazo del grupo de genes murinos por el gen o grupo de genes humanos equivalente. El procedimiento también está adaptado a la humanización de un sistema genético murino que contenga un alto nivel de redundancia a nivel genético. A diferencia de los procedimientos que se han usado anteriormente, no hay exigencias ni preferencias en cuanto a que el/los gene/s intercambiado/s sea/n un gen segmentado, tal como un gen de inmunoglobulina; en las realizaciones preferidas, el/los gen/s intercambiado/s no es/son un gen segmento, tal como un gen de inmunoglobulina.

45 Por lo tanto, preferentemente, el producto de expresión de al menos un gen diana murino conserva la misma función, o una función similar o idéntica a la del gen humano equivalente de reemplazo. Los genes pueden ser funcionalmente equivalentes y/o estructuralmente homólogos. Por ejemplo, un gen diana murino y un gen humano de reemplazo pueden compartir un grado de homología. Preferentemente, dicha homología será mayor del 30%, mayor del 40%, mayor del 50%, mayor del 60%, mayor del 70%, mayor del 80%, mayor del 90% o incluso mayor del 95%.

50 La secuencia de genes humanos de reemplazo puede comprender ADNc, ADN genómico o una mezcla de ambos. El ADN genómico es ventajoso en muchas circunstancias, porque se conservará la fidelidad del corte y empalme. Sin embargo, puede que sólo sea necesario conservar aquellos intrones en los que tengan lugar la mayoría de los cortes y empalmes, de modo que el resto de la secuencia pueda ser ADNc. Esto puede simplificar el procedimiento de clonación, particularmente, cuando el ADN genómico comprende intrones de gran tamaño. En dichos casos, se puede no incluir los intrones de mayor tamaño, siempre y cuando no se codifiquen isoformas de corte y empalme para esta zona del ADN genómico.

55 Los ejemplos de genes particularmente adecuados para su uso en el procedimiento de la presente invención son genes de enzimas metabolizadoras de fármacos, que incluyen, por ejemplo, enzimas metabolizadoras de fármacos de fase 1, enzimas metabolizadoras de fármacos de fase II y factores de transcripción. Los ejemplos incluyen la familia de

enzimas *cyp*, una familia de hemoproteínas que contiene un centro hemo de hierro y oxidan una variedad de sustratos a través de un sistema de transporte de electrones. El centro hemo de la proteína *cyp* es reducido por electrones transmitidos desde la reductasa del citocromo P450, ferredoxinas o el citocromo b5, el oxígeno molecular se une y es roto mediante el grupo hemo reducido, y el sustrato se oxida en un alcohol o un epóxido, con la regeneración del estado Fe<sup>3+</sup> en reposo del grupo hemo. Nelson *et al.*, 2004 (*Pharmacogenomics* 14(1); 1-18) proporcionan una revisión de dichas proteínas que compara los genes CYP humanos y murinos. Otros ejemplos serán evidentes para los expertos en la técnica.

Preferentemente, el ADN humano que codifica una enzima metabolizadora de fármacos de fase 1 se selecciona del grupo que comprende los citocromos P450, incluyendo, pero no limitándose a CYP3A4, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 y CYP2D6. En este ejemplo, se puede evaluar la equivalencia entre los genes mediante una combinación de la especificidad por el sustrato, el modo de regulación (por ejemplo, mediante factores de transcripción o fármacos exógenos), la homología de secuencias y la distribución de tejidos. Ciertos genes tienen equivalentes exactos; los ejemplos de dichos genes son CYP2E1, CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6 y CYP2D, en los que sólo hay un gen en el ser humano, pero numerosos genes equivalentes en el ratón. Existen cuatro genes CYP2C en el ser humano y numerosos genes equivalentes en el ratón. En dichas circunstancias, se anulan al menos uno, preferentemente, dos, tres, cuatro, cinco o más, o incluso todos los genes murinos equivalentes. CYP3A4 es un ejemplo en el que no hay un ortólogo evidente en el ratón, pero CYP3A11 se podría considerar al menos un gen murino equivalente, debido a su expresión hepática, modo de regulación y homología secuencial. Otro ejemplo lo puede proporcionar el caso de CYP2D6, en el que hay nueve genes en el ratón que corresponden a un solo gen funcional en seres humanos.

La elección de las isoformas de P450 humanas para su introducción en animales no humanos humanizados con P450 se debe principalmente a la importancia relativa conocida de diversas isoformas de P450 en el metabolismo del tejido relevante. Así pues, por ejemplo, hasta la fecha, la única isoforma de P450 más relevante reconocida en el hígado humano es CYP3A4, y por tanto CYP3A4 es probablemente la primera isoforma de P450 humana que se elige para la humanización del hígado con P450. La elección de las P450 humanas para el ratón humanizado con múltiples P450 de la presente invención está dictada por las necesidades del usuario. A este respecto, se espera que se preferirán una cualquiera o más de las siguientes isoformas humanas: 3A4, 3A5, 2D6, 2B6, 2C9, 2C19, 1A1, 1A2, 2C8, 2E1. Sin embargo, ha de reconocerse que la/s isoforma/s incorporada/s en la célula animal dependan de las necesidades del usuario. De este modo, es posible "diseñar" el animal transgénico humanizado para investigar la función de determinadas isoformas en el proceso metabólico.

Según las enseñanzas de la invención, es posible reemplazar genes individuales, grupos de genes o combinaciones de genes individuales con grupos de genes. En la medida de lo posible, se reemplazarán preferentemente grupos enteros de genes, en lugar de reemplazar simplemente genes individuales. Esto genera una situación en la que las proporciones de los niveles de expresión de los genes de cualquier grupo de genes son iguales a las proporciones en las que estos genes se expresan *in vivo*. Se pretende que el grupo de genes introducido sea funcionalmente equivalente al gen murino diana o, si hay grupos de genes equivalentes, que sea equivalente al grupo de genes murinos diana. El reemplazo del gen o de los genes murinos diana apropiados por la secuencia o secuencias de genes humanos de reemplazo equivalentes producirá, por tanto, la humanización del genoma, de la célula, del tejido, del órgano o del organismo con independencia de si el grupo humano o murino contiene el mismo número de genes.

El término "grupo", como se usa en la presente memoria, es por tanto cualquier región del genoma que tiene la capacidad de generar más de dos productos génicos e incluye múltiples cortes y empalmes del mismo gen. En este aspecto, el grupo de genes puede codificar preferentemente las proteínas implicadas en el metabolismo, y más preferentemente, puede formar parte del grupo de genes del citocromo P450 (*cyp*). Por ejemplo, se considera que hay siete grupos de genes del P450 en el ratón, el grupo CYP2ABFGST, el grupo CYP2C, el grupo CYP2D, el grupo CYP2J, el grupo CYP3A, el grupo CYP4ABX y el grupo CYP4F. Los grupos CYP3A, CYP2C y CYP2D son grupos preferidos de enzimas metabolizadoras de fármacos de fase 1 para realizar el reemplazo según la presente invención. Se puede reemplazar uno cualquiera o más de estos grupos de genes según la presente invención.

Según la invención, por lo tanto, se pueden reemplazar preferentemente cascadas parciales o, preferentemente, completas de genes que estén implicados en una determinada ruta. Esto garantiza la conservación de la redundancia parcial de la función génica y así, de nuevo, el reflejo de la situación fisiológica real. Preferentemente, los grupos de enzimas metabolizadoras de fármacos de fase 1 que se usan para la humanización son el grupo CYP3A y el grupo CYP2C.

En vista de la redundancia en la función proteica entre el ser humano y los animales transgénicos diana comúnmente usados, tales como el ratón, la humanización para las enzimas metabolizadoras de fármacos de fase 1 se realiza preferentemente frente a un fondo delecionado en el que sólo algunas (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5) y, preferentemente, ninguna enzima metabolizadora de fármacos de fase 1 se expresa a niveles relevantes.

Otros ejemplos de enzimas metabolizadoras de fármacos humanas que son candidatas para la humanización según la invención incluyen las glucuronil-transferasas, por ejemplo, el gen o grupo de genes UGT1A, las glutationa-transferasas, por ejemplo, GST (glutationa-S-transferasas), las sulfonil-transferasas y las acetil-transferasas. Preferentemente, un grupo de enzimas metabolizadoras de fármacos de fase 2 que se usa para la humanización es el grupo UGT1A.

### Secuencias reguladoras

Las secuencias reguladoras que rigen la expresión del/de los factor/es de transcripción pueden ser preferentemente bien de origen humano o pueden proceder de la especie animal diana, p.ej., del ratón.

5 En la mayoría de los casos, se deseará usar secuencias reguladoras humanas. Esto se puede efectuar simplemente incluyéndolas en la secuencia de genes humanos de reemplazo que se inserta en el cromosoma murino mediante recombinación homóloga. Así pues, el sitio RT se inserta de modo que la secuencia diana murina, flanqueada por ambos sitios RT, incluya el/los promotor/es murino/s endógeno/s que será/n posteriormente escindido/s tras la recombinación específica de sitio.

10 Como se muestra en la Figura 5, es necesario tener en cuenta varios factores a la hora de decidirse sobre el uso de secuencias reguladoras humanas. Estos incluyen la orientación de los genes murinos en el borde del grupo y la disponibilidad de información sobre los promotores murinos y los elementos potenciadores. Sin embargo, generalmente, existe un mecanismo mediante el cual es posible insertar el promotor humano funcionalmente en el genoma murino para controlar la expresión del/los gen/es humanizado/s.

15 En una realización ventajosa preferida cuando se usan secuencias reguladoras humanas, particularmente, cuando se inserta un gen de reemplazo en una zona del cromosoma murino que sea transcripcionalmente activa, es posible fusionar una secuencia de poliadenilación artificial con un exón de secuencia abajo de cualquier gen o genes de secuencia arriba de la secuencia humana insertada. Por ejemplo, en este contexto, se puede usar un sitio de poliadenilación aceptor de cortes y empalmes (sApA) similar al uso de esta secuencia según lo descrito por Ishida y Leder (*Nucleic Acids Res.* 27(24), e35, 1999). Esto garantiza que no haya translectura desde la actividad transcripcional secuencia arriba del gen humano de reemplazo introducido y la secuencia reguladora, lo que permite un estudio exacto de la secuencia humana, sin que influyan otras secuencias promotoras.

20 En algunas circunstancias, la inserción del/de los gen/es humano/s en la posición del cromosoma murino ocupada anteriormente por el gen diana murino puede permitir el uso de las secuencias reguladoras endógenas del gen murino, con la condición de que las secuencias reguladoras endógenas adecuadas estén ubicadas en la orientación requerida en el borde del grupo murino, como se muestra en la Figura 4.

25 En algunos casos en los haya probabilidad de utilizar la invención, se usarán las secuencias reguladoras murinas endógenas. De este modo, los animales humanizados creados según la presente invención pueden expresar las proteínas humanas no sólo a los niveles fisiológicos apropiados, sino en todos los tejidos en los que el ratón normalmente expresaría la/s proteína/s endógena/s equivalente/s. Sin embargo, cabe destacar que las secuencias reguladoras murinas, en algunos casos, podrían aportar una expresión más humana a un gen humano del ratón que el correspondiente promotor humano. Por ejemplo, aunque CYP3A4 se expresa constitutivamente en el hígado de los varones adultos, en los ratones transgénicos, el promotor CYP3A4 parece estar silenciado en el hígado de los machos con más de seis semanas de vida. Por lo tanto, el uso del promotor Cyp3a11 murino, que muestra una expresión hepática y una regulación similares al promotor CYP3A4 en seres humanos, para dirigir la expresión de CYP3A4 humano podría dar una expresión más auténtica de este gen en ratones.

30 En esta realización, en la que se sabe que hay un promotor murino endógeno presente en la ubicación y orientación correctas para dirigir la expresión de la secuencia de genes humanos de reemplazo, los sitios RT se han de insertar en el cromosoma murino de manera que el que está secuencia arriba del par de sitios RT se encuentre entre el gen diana murino y el promotor murino endógeno del gen diana murino. Tras la recombinación específica del sitio, el promotor murino endógeno que permanece en el cromosoma se une transcripcionalmente a la secuencia de genes humanos de reemplazo para realizar la transcripción de la secuencia de genes humanos de reemplazo, como se muestra en la Figura 4A. La expresión "genes reguladores" pretende incluir cualquier secuencia promotora o potenciadora, UTR 5' o 3', secuencias de terminación poly(A) u otras secuencias de ADN que sean necesarias para la transcripción del gen de interés. Los transcriptos usados para la inserción de las secuencias humanas terminan preferentemente con un motivo poly(A).

35 Por "promotor endógeno" se pretende significar el promotor que dirige de manera natural la expresión del gen de interés en el ratón.

40 Se ha observado que, tanto para las secuencia promotoras endógenas como para las humanas, realmente no es necesario ni, habitualmente, deseable incorporar toda la secuencia de arriba 5' que es necesaria para la actividad promotora y que, preferentemente, incluye cualquier potenciador, para usar potentes promotores constitutivos; como ocurre en la naturaleza, el promotor endógeno o el promotor inducible humano en su totalidad es perfectamente capaz de dirigir la expresión de la proteína relevante de una manera fisiológicamente relevante. Se proporciona un ejemplo mediante el gen CYP1A2 humano, que posee potentes elementos potenciadores secuencia arriba del punto de inicio de la transcripción. Aunque la incorporación de toda esta secuencia humana permite que se produzca el mecanismo apropiado de transcripción, la omisión de estas secuencias de secuencia arriba conduce a un sistema en el que hay secuencias reguladoras incompletas o insuficientes para permitir la conservación de la fidelidad de la expresión génica, como muestran Chen *et al.* (*Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 318, 1330-1342, 2006).

55 Una desventaja de usar los promotores, tales como el promotor de albúmina, que se han usado en la técnica anterior,

particularmente, en el caso de los genes metabolizadores de fármacos, tales como CYP3A2, es que sólo es posible monitorizar los efectos de la expresión de un gen en un determinado tejido, en el caso del promotor de albúmina, en el hígado. Como es obvio, muchos genes tienen patrones bastante diversos de expresión y, a menudo, su investigación ha sido escasa. El uso del promotor murino endógeno o del promotor humano correspondiente subsana todos los problemas citados y garantiza que el gen humano, si está configurado y alineado apropiadamente en el cromosoma, conserve la fidelidad del nivel de expresión murino de tipo natural, evolutiva y temporalmente, y de un modo específico del tejido. Como consecuencia de ello, la proteína humana se produce en el lugar correcto, en el nivel correcto, en el momento correcto y durante la cantidad de tiempo apropiada. En el caso de un ratón humanizado para CYP3A2, por tanto, la invención permite la obtención de una panorámica global y holística del proceso de metabolismo farmacológico.

El uso del promotor endógeno o del correspondiente promotor humano también conlleva otras ventajas. En particular, se conserva la fidelidad de la expresión evolutiva. El uso del promotor endógeno natural garantiza que la proteína se exprese en los tejidos en los que lo hace de manera natural, y no sólo en el animal adulto, sino también en cada fase evolutiva. Esto también tiene la ventaja de que los animales transgénicos tienen una mayor tendencia a ser viables y a ser, por tanto, útiles como rastreos y en el desarrollo de cruces en dirección 3'. En el caso de los genes de metabolismo farmacológico, también permite el uso de los animales para rastrear efectos teratogénicos de un compuesto de prueba, cuando la expresión en la placenta de enzimas metabolizadoras de fármacos se conserva. En algunas circunstancias, el gen diana y la secuencia de genes humanos de reemplazo pueden compartir una secuencia líder. Esto se puede lograr conservando al menos un intrón en el constructo, lo que habitualmente produce una mejor expresión. Esta estrategia también garantiza que el producto génico sea guiado hacia la ubicación intracelular correcta. La secuencia líder humana también podría ser capaz de desempeñar esa función, pero habitualmente es más seguro usar la secuencia líder murina en su lugar. Por ejemplo, en el caso de la proteína MRP2, es posible conservar la "secuencia líder" de la proteína murina, que está codificada por el exón 1. Entonces, se introduce el ADNc humano sin las secuencias del exón 1 en el exón 2 de la secuencia genómica murina. Los sitios de corte y empalme originales del intrón 1 murino se conservarán, de manera que este constructo codifique una proteína de fusión de aminoácidos del exón 1 murino y los exones 2-32 humanos. Este constructo garantiza un alto nivel de expresión y también que el MRP2 sea guiado a su ubicación correcta, la membrana plasmática.

El experto también comprenderá cómo se puede llevar la secuencia de genes humanos de reemplazo bajo el control del promotor del gen diana en el ratón, de manera que se ligue transcripcionalmente a ese promotor. La expresión "transcripcionalmente ligado" pretende significar que la actividad del promotor dicta el nivel de expresión de la correspondiente proteína. Preferentemente, esto se consigue fusionando la secuencia de genes humanos de reemplazo con el sitio de inicio de la traducción del correspondiente promotor murino. Por ejemplo, en el caso de la proteína de resistencia a múltiples fármacos MDR1, se puede fusionar el ADNc de la MDR1 humana con el sitio de inicio de la traducción de los correspondientes genes murinos (*Mdr1a* o *Mdr1b*). En el ejemplo del factor de transcripción PXR, es posible fusionar un híbrido del ADNc del PXR humano y secuencias genómicas con el sitio de inicio de la traducción del gen PXR murino, mediante lo que se conserva el Inicio-ATG murino. En el caso de otro factor de transcripción humano, como el CAR, se puede fusionar la secuencia humana con el sitio de inicio de la traducción del gen CAR murino.

### Genes indicadores

La presente invención también ventajosamente proporciona células de animales no humanos y animales no humanos transgénicos que tienen incorporados genes indicadores introducidos de manera que dichas células o dichos animales se pueden usar para determinar el rastro de las rutas del metabolismo de fármacos u otros compuestos xenobióticos en una célula humana mediante el conveniente análisis de los productos de la expresión de los genes indicadores.

Cuando los genes indicadores se han incorporado en una célula de animal no humano o en animales no humanos transgénicos producidos mediante el procedimiento de la invención (véase más adelante), las células o los animales se pueden usar para determinar la regulación de los genes y también dar indicaciones del mecanismo probable y del metabolismo de los fármacos u otros compuestos xenobióticos en una célula humana homóloga mediante el análisis de la expresión de la secuencia de ADN de los genes indicadores. Las células o los animales también se pueden usar para indicar el grado de metabolismo de fármacos u otros compuestos xenobióticos. Por ejemplo, el análisis de la distribución de la expresión de genes indicadores en un determinado tejido permite la monitorización del grado de inducción de la expresión de los genes como respuesta a un determinado compuesto farmacológico.

Los genes indicadores son secuencias de ácidos nucleicos que codifican directa o indirectamente proteínas analizables. Se usan para reemplazar otras regiones codificantes cuyos productos proteicos no son adecuados o no están adaptados al análisis previsto. Los genes indicadores adecuados que se conocen en la técnica y que se pueden usar en la presente invención se seleccionan entre aquellos genes que codifican proteínas, incluyendo pero no limitándose a: cloranfenicol-acetiltransferasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa, luciferasa, beta-galactosidasa, proteína verde fluorescente, fosfatasa alcalina secretada (SEAP), proteína urinaria principal (MUP) o gonadotropina coriónica humana (hCG). Se entenderá que la lista anterior de genes indicadores adecuados no es exhaustiva ni excluyente, y no pretende limitar el alcance de la solicitud. El experto en la técnica puede elegir otro sistema indicador que será igualmente aplicable en la presente invención.

Según la invención, los promotores murinos que son dianas preferidas para la unión con genes indicadores son PXR, CAR, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2B6, CYP2D6, UGT1A, MRP2 y MDR1.

**Sitios adicionales de recombinación específica de sitio**

5 En una realización más de la invención, se puede incorporar un segundo par de sitios RT en el cromosoma murino, de nuevo, preferentemente, mediante recombinación homóloga. Este segundo par de sitios RT ha de ser colocado de manera que ambos sitios RT flanqueen el primer par de sitios RT, como se muestra en la Figura 1. Este segundo par de sitios RT permite la escisión de la secuencia de genes humanos de reemplazo si así se desea. Esto permite la generación de un conjunto o equipo de ratones transgénicos con propiedades comparables; todo el conjunto puede comprender, por tanto, animales de tipo natural, animales humanizados con activación de los genes o animales con desactivación completa de los genes. Además, para ciertas aplicaciones, también se pueden comparar en el equipo ratones heterocigóticos para activaciones o desactivaciones de genes.

El segundo par de sitios RT se puede insertar en el cromosoma murino simultáneamente antes o después de situar la RT entre el primer par de sitios de recombinación específica de sitio. Preferentemente, los dos pares de sitios se insertan simultáneamente para facilitar el diseño genético y la clonación.

15 Tras la recombinación específica de sitio entre el primer par de sitios RT, el segundo par de sitios RT estará colocado en el cromosoma, flanqueando la secuencia de genes humanos de reemplazo. En esta configuración, el sitio RT residual producido durante la recombinación entre el primer par de sitios RT, se colocará entre un componente del segundo par de sitios de recombinación específica de sitio y la secuencia de genes humanos de reemplazo, como se muestra en la Figura 1.

20 En este aspecto, se pretende que sea posible lograr una segunda serie de RT entre el segundo par de sitios RT, de modo que la secuencia de genes humanos de reemplazo se escinda y se desactive el gen de interés. En la presente memoria, el primer sitio RT residual también se escindirán, mientras que el segundo sitio RT residual permanecerá.

Es posible incorporar el segundo par de sitios RT y el primer par de sitios RT en el cromosoma murino bien simultáneamente o por separado.

25 Cuando se va a incorporar el segundo par de sitios RT simultáneamente al primer par de sitios RT, preferentemente, un componente de cada par estará contenido en una sola secuencia de ácidos nucleicos, que se puede incorporar en el cromosoma murino mediante una serie de recombinación homóloga. El otro componente de cada par puede estar contenido en una segunda secuencia de ácidos nucleicos, que también se incorpora en el cromosoma murino mediante una segunda serie de recombinación homóloga. Cada componente del segundo par de sitios RT se sitúa en el cromosoma, de modo que una mitad del primer par de sitios RT está colocada entre la mitad del segundo par de sitios RT y el marcador seleccionable. Estas dos series de recombinación homóloga pueden tener lugar simultáneamente o por separado.

30 Cuando se va a incorporar el segundo par de sitios RT en el cromosoma murino por separado del primer par de sitios RT, cada mitad del segundo par de sitios RT está contenida, preferentemente, en una secuencia de ácidos nucleicos separada, y el segundo par de sitios RT se incorpora en el cromosoma murino mediante dos reacciones más de recombinación homóloga separadas, mediante el mecanismo mostrado en la Figura 2. Estas otras dos series de recombinación homóloga pueden tener lugar simultánea o consecutivamente entre sí y con respecto a las dos primeras series de recombinación homóloga. Se entenderá que las reacciones de recombinación están destinadas a realizarse bien *in vivo* o *in vitro*.

40 Se prefiere que el primer y segundo par de sitios RT sean diferentes entre sí.

**Ratones transgénicos**

Aquí se describe en mayor profundidad un ratón transgénico producido mediante un procedimiento de una cualquiera de las realizaciones de la invención descritas anteriormente. Dicho ratón está humanizado para un gen o grupo de genes, habiéndose delecionado el gen o el grupo de genes murinos correspondiente.

45 A continuación se describirán más detalladamente a modo de ejemplo diversos aspectos y realizaciones de la presente invención. Ha de reconocerse que es posible realizar modificaciones sin alejarse del ámbito de la invención.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1:** Humanización para CYP3A4 usando el correspondiente promotor humano y la desactivación del grupo CYP3A murino

50 Se flanqueó el grupo CYP3A murino con los sitios LoxP y FRT, y se insertó un casete de expresión de CYP3A4 en un extremo del grupo murino, como se muestra en la Figura 7, permitiendo la expresión de CYP3A4 humano bajo el control del promotor CYP3A4 humano de 13 kb.

Los elementos de la secuencia de LoxP incluidos en los vectores dirigidos permiten la delección mediada por Cre del

grupo CYP3A murino para permitir la expresión de CYP3A4 en ausencia de los correspondientes genes murinos (véase la Figura 7).

Posteriormente, los elementos de la secuencia de FRT permiten la delección mediada por Flp del casete de expresión humano, dando como resultado una desactivación completa en el locus de CYP3A murino (Figura 7).

5 **Ejemplo 2:** *Humanización para CYP2C9 usando los correspondientes promotores humanos y la desactivación del grupo CYP2C murino*

Se flanqueó el grupo CYP2C murino con los sitios LoxP y FRT, y se insertó un casete de expresión de CYP2C9 en un extremo del grupo murino, como se muestra en la Figura 8, permitiendo la expresión de CYP2C9 humano bajo el control del promotor CYP2C9 humano de 12 kb.

10 Los elementos de la secuencia de LoxP incluidos en los vectores dirigidos permiten la delección mediada por Cre del grupo CYP2C murino para permitir la expresión de CYP2C9 en ausencia de los correspondientes genes murinos (Figura 8).

Posteriormente, los elementos de la secuencia de FRT permiten la delección mediada por Flp del casete de expresión humano, dando como resultado una desactivación completa en el locus de CYP2C murino (Figura 8).

15 **Ejemplo 3:** *Humanización para CYP2D6 usando el correspondiente promotor humano y la desactivación del grupo CYP2D murino*

Se flanqueó el grupo CYP2D murino con los sitios LoxP y FRT, y se insertó un casete de expresión de CYP2D6 en un extremo del grupo murino, como se muestra en la Figura 9, permitiendo la expresión de CYP2D6 humano bajo el control del promotor CYP2D6 humano de 9 kb.

20 Los elementos de la secuencia de LoxP incluidos en los vectores dirigidos permiten la delección mediada por Cre del grupo Cyp2d murino para permitir la expresión de CYP2D6 en ausencia de los correspondientes genes murinos. Posteriormente, los elementos de la secuencia de FRT permiten la delección mediada por Flp del casete de expresión humano, dando como resultado la desactivación completa en el locus de CYP2D murino.

25 El uso de cebadores específicos ha permitido el análisis del cromosoma murino mediante PCR. Los resultados demuestran una introducción satisfactoria de la secuencia de genes CYP2D humanos de reemplazo deseada y la delección del grupo Cyp2d murino (véanse las Figuras 10A y 10B). La Figura 10C demuestra que la proteína CYP2D6 humana se expresa correctamente en el hígado de estos ratones.

**Ejemplo 4:** *Humanización para CYP3A4 usando el promotor Cyp3a11 murino y la desactivación del grupo CYP3A murino*

30 Se inserta una secuencia de ADN que codifica el CYP3A4 humano en el grupo Cyp3a murino, en el locus Cyp3a11, como se muestra en la Figura 10, permitiendo la expresión del CYP3A4 humano bajo el control del promotor Cyp3a11 murino. Esta estrategia de direccionamiento está diseñada para permitir la expresión de CYP3A4 en ratones macho, lo que puede ser posible usando el promotor CYP3A4.

35 La secuencia de ADN que codifica el CYP3A4 humano comprende al menos parte del intrón 1 del gen CYP3A4 humano (véase la Figura 10).

Debido a la inclusión de los sitios FRT en el vector dirigido como se muestra en la Figura 10, es posible eliminar el marcador seleccionable (neo<sup>R</sup> de la Figura 10) cruzándolo con una cepa delecionadora de FLP, tras la inserción del CYP3A4 humano en el locus Cyp3a11 murino de tipo natural.

40 Debido a la inclusión de ambos sitios LoxP y FRT en el vector dirigido, como se muestra en la Figura, se puede delecionar la mayoría del grupo Cyp3a11 murino cruzándolo con una cepa delecionadora de FLP o una cepa delecionadora de Cre, si se inserta el CYP3A4 humano en las células dirigidas en dirección 5' al grupo Cyp3a.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para humanizar un ratón para un gen de interés, que comprende:
  - a) incorporar un par de sitios de recombinación específica de sitio en el genoma murino mediante recombinación homóloga, de manera que la secuencia diana de genes murinos que se vaya a reemplazar esté  
5      flanqueada a cada lado por un sitio de recombinación;  
en el que al menos uno de los dos sitios de recombinación se crean para que sean contiguos a una secuencia de genes humanos de reemplazo;  
y siendo dicha secuencia de genes humanos de reemplazo colocada para que dicho sitio de recombinación se encuentre entre dicha secuencia de genes humanos de reemplazo y dicha secuencia diana de genes murinos;
  - b) realizar la recombinación entre los sitios de recombinación específica de sitio, de modo que la secuencia humana se introduzca en la posición del genoma murino previamente ocupada por el gen diana murino, flanqueada por el sitio residual de recombinación específica de sitio.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la secuencia de genes humanos de reemplazo se inserta en el punto del cromosoma murino en el que el gen diana murino equivalente endógeno se encuentra de manera natural.
- 15   3. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que la secuencia de genes humanos de reemplazo contiene un grupo de genes, opcionalmente, un grupo de genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo farmacológico, tal como un grupo de genes que forma parte de un grupo de genes del citocromo P450 (*CYP*).
- 20   4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la transcripción de dicha secuencia de genes humanos de reemplazo está bajo el control de una o más secuencias reguladoras murinas endógenas o la/s secuencia/s reguladora/s humana/s endógena/s.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cada sitio de recombinación específica de sitio se crea para que sea contiguo a un marcador seleccionable.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que cada marcador seleccionable se sitúa de modo que dicho marcador seleccionable se encuentra entre dicha secuencia diana murina y dicho sitio de recombinación.
- 25   7. El procedimiento de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que cada uno de dichos marcadores seleccionables son diferentes entre sí.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se incorpora un segundo par de sitios de recombinación específica de sitio en el genoma murino; en el que cada sitio del segundo par de sitios de recombinación flanquea el primer par de sitios de recombinación, de modo que la secuencia humana de reemplazo se puede escindir realizando una  
30      recombinación específica de sitio entre este segundo par de sitios.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la secuencia de genes humanos de reemplazo está situada entre la mitad del primer par de sitios de recombinación específica de sitio y la mitad del segundo par de sitios de recombinación específica de sitio.
- 35   10. El procedimiento de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, que comprende además realizar una segunda serie de recombinación entre el segundo par de sitios de recombinación específica de sitio, de modo que se escinda la secuencia de genes humanos de reemplazo y se desactive el gen de interés.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la recombinación específica de sitio tiene lugar en una célula madre embrionaria murina.
- 40   12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la célula madre embrionaria se inserta posteriormente en un blastocisto y, opcionalmente, en el que después se transplanta el blastocisto en un ratón pseudo-preñado.
- 45   13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la recombinación específica de sitio se realiza *in vivo* y la recombinación específica de sitio se realiza cruzando un ratón transgénico generado según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores con un ratón que expresa una recombinasa específica de sitio que reconoce los sitios de recombinación específica de sitio usados al incorporar la secuencia de genes humanos de reemplazo en el genoma del ratón transgénico.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la expresión de la recombinasa específica de sitio se limita a un determinado tejido.
15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que la recombinasa es albúmina-Cre.



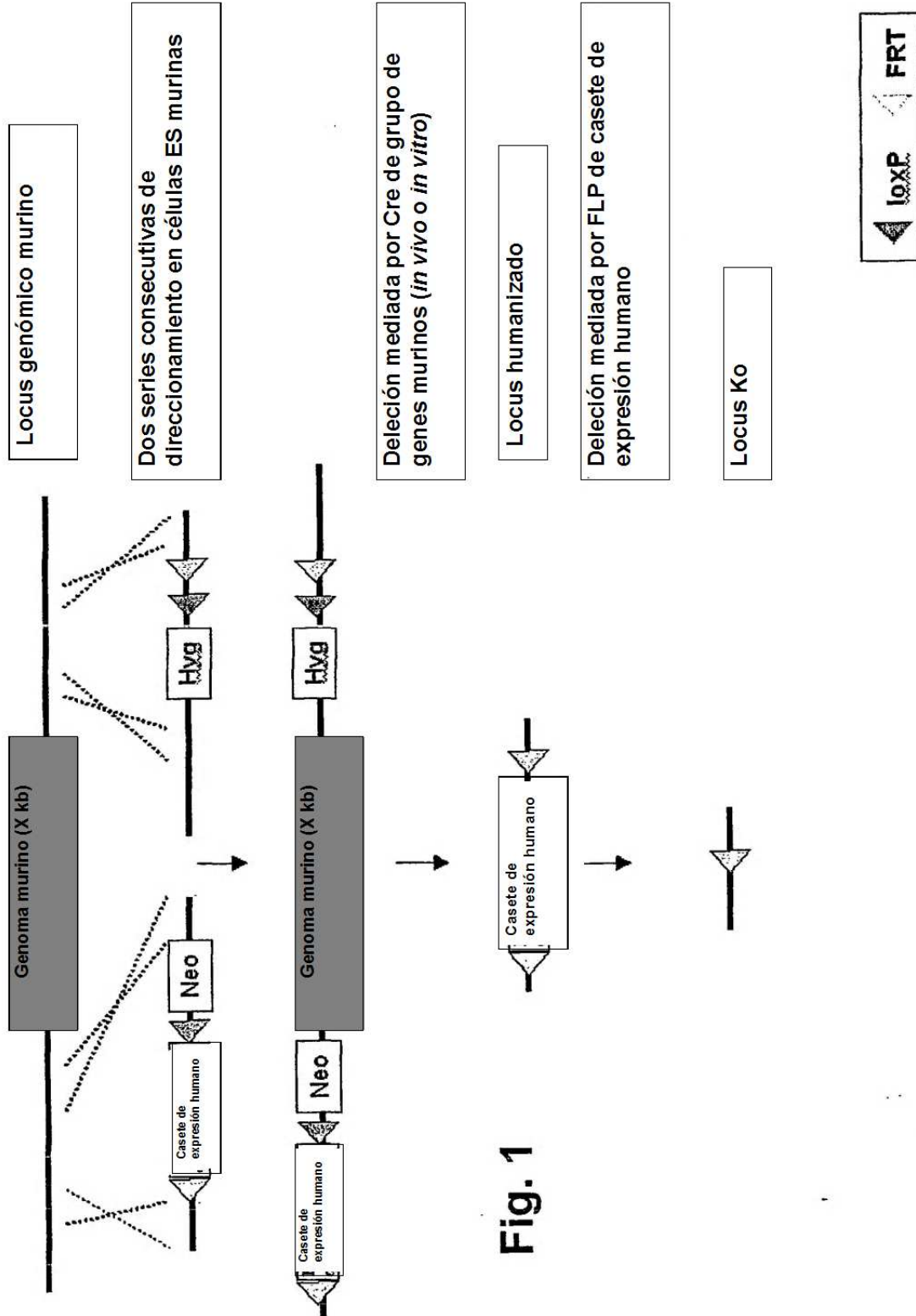
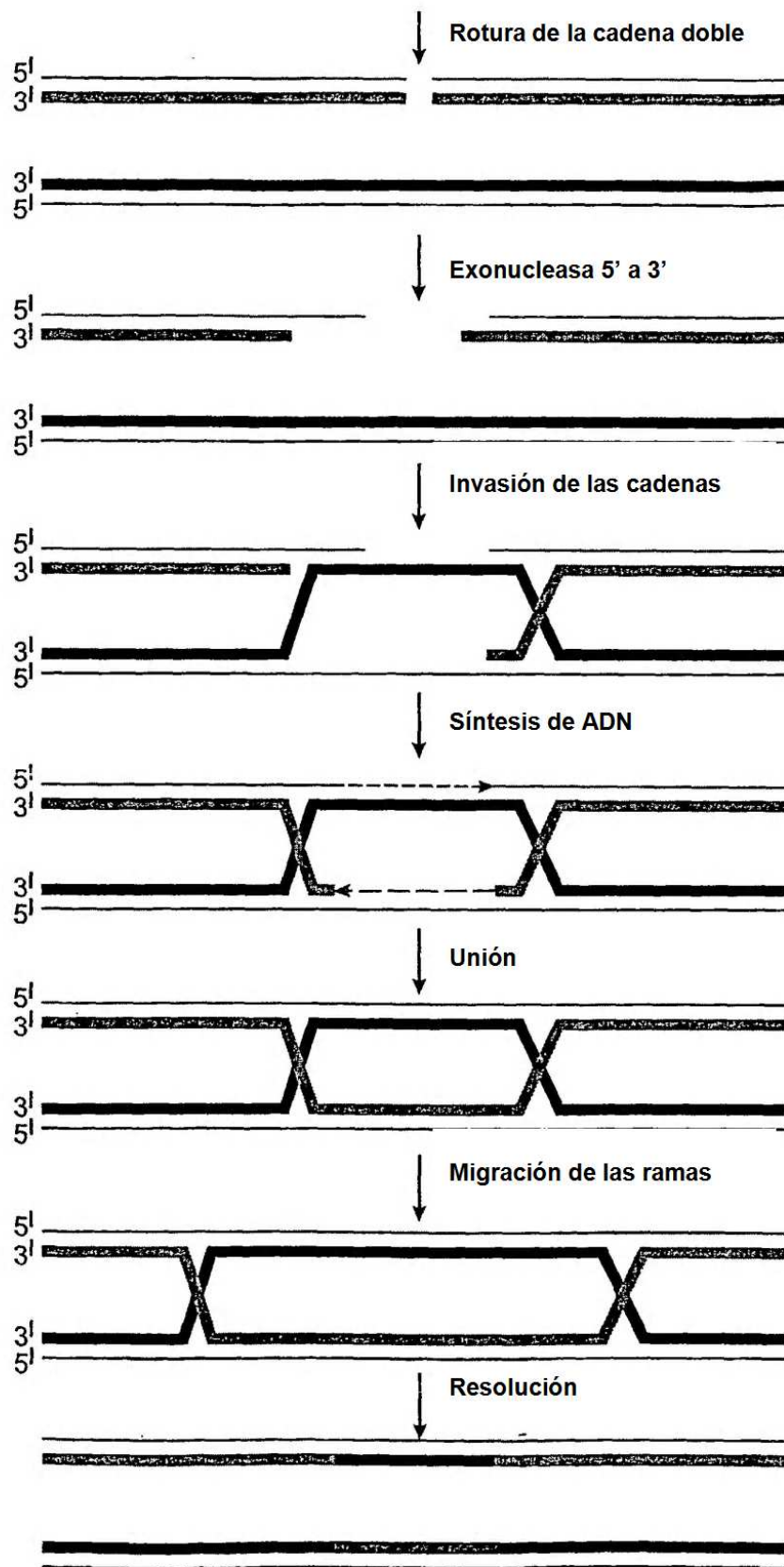


Fig. 1

**FIG. 2**



# FIG. 3A

ATAACTTCGTATA-// -GCATACAT-// -TATACGAAGTTAT

# FIG. 3B

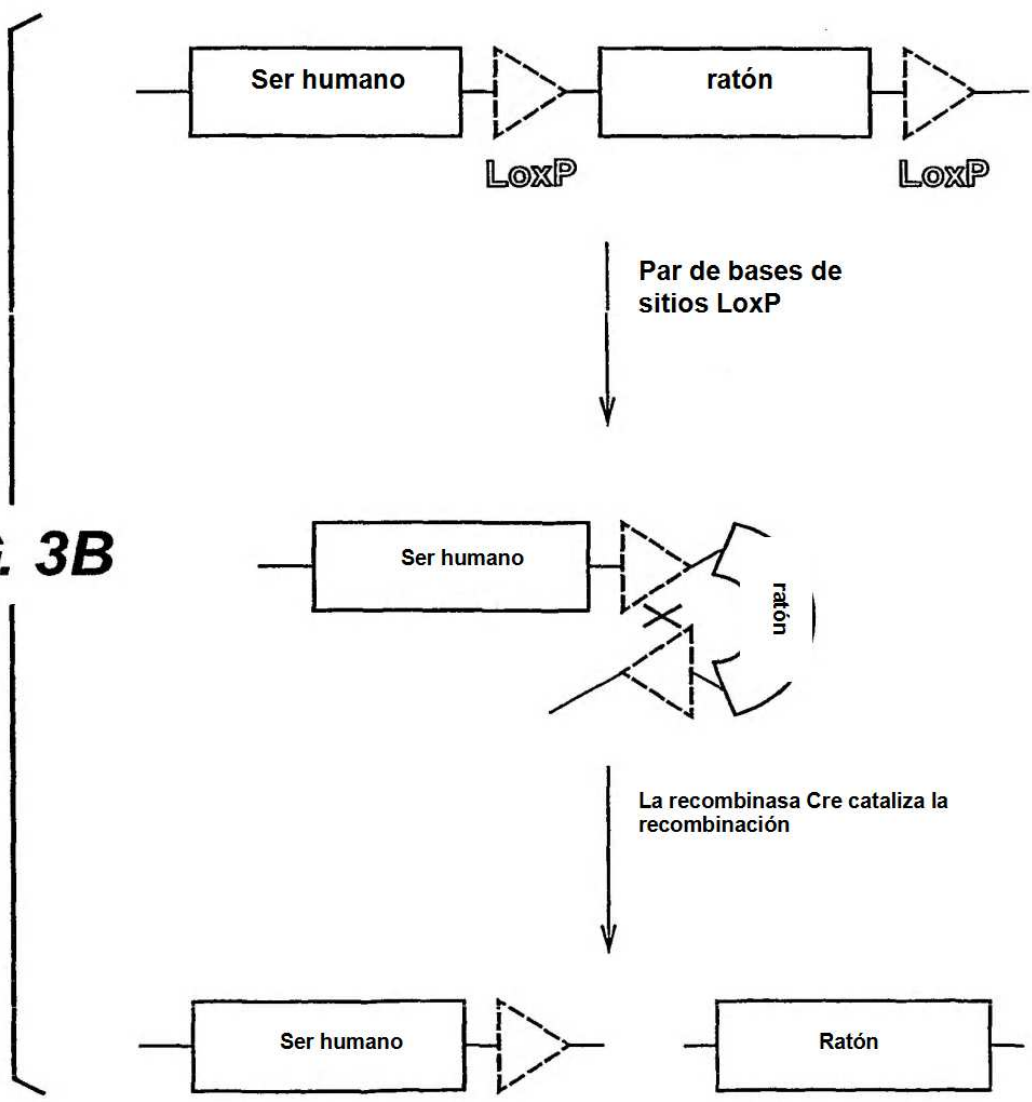


Figura 4

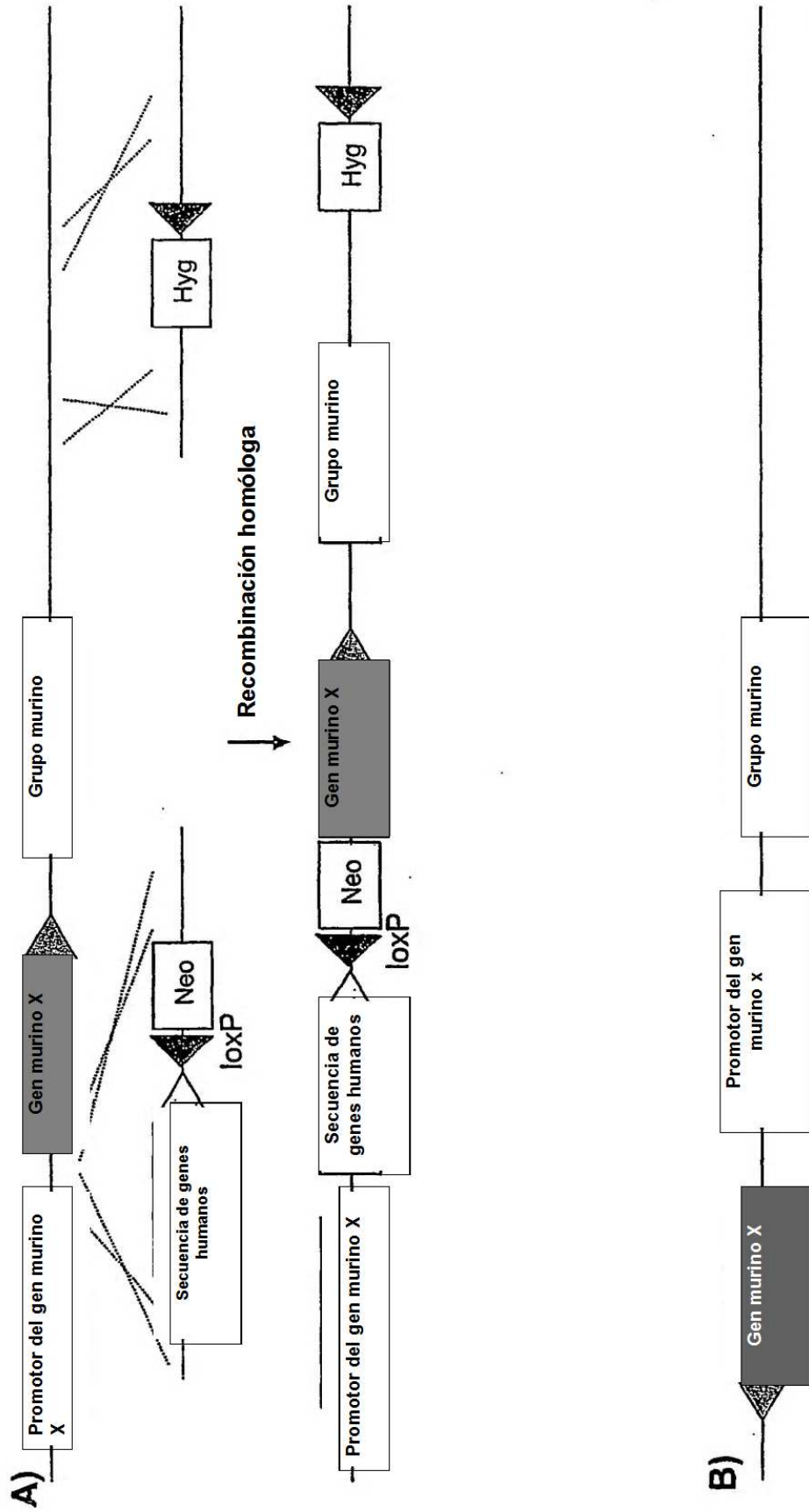
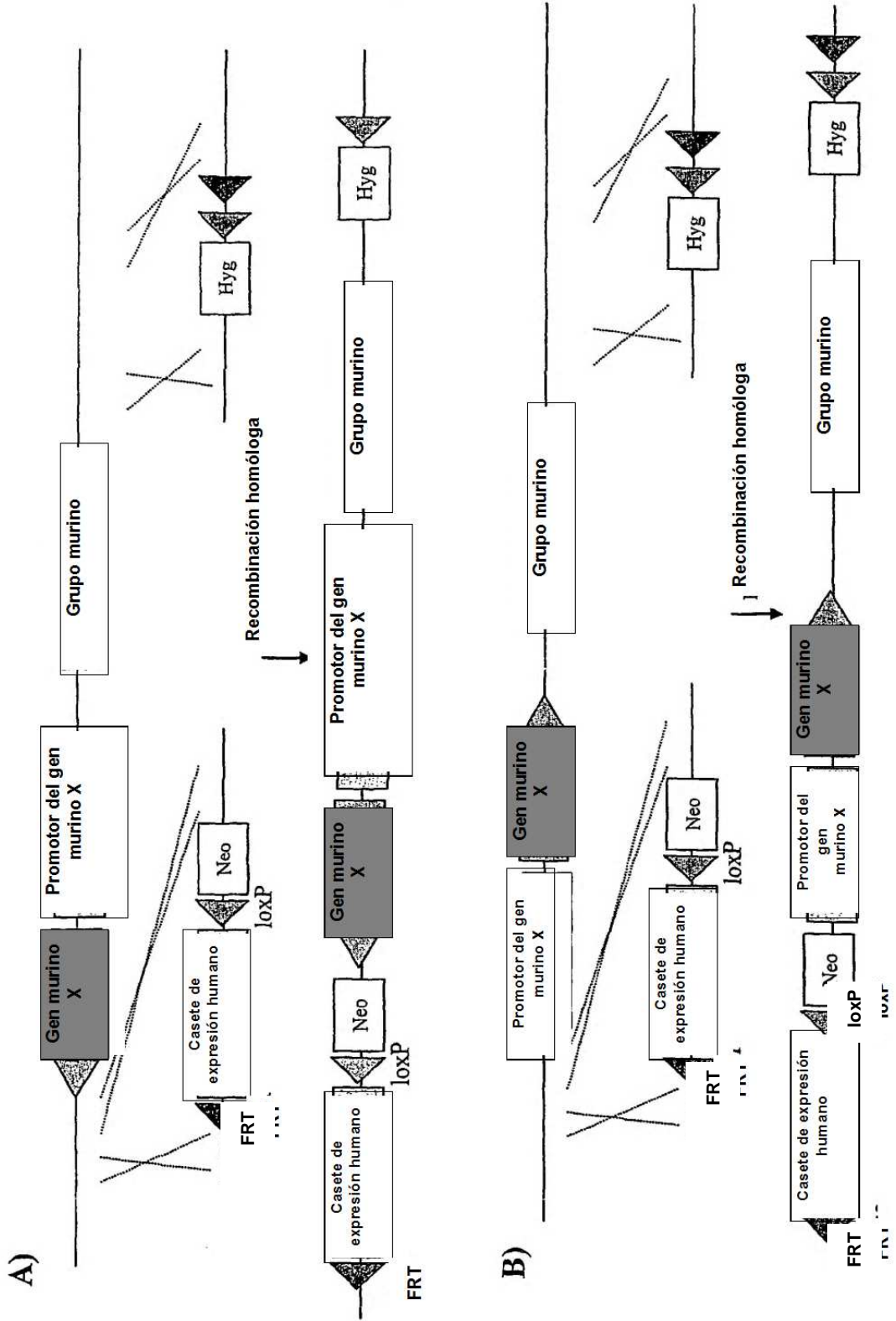
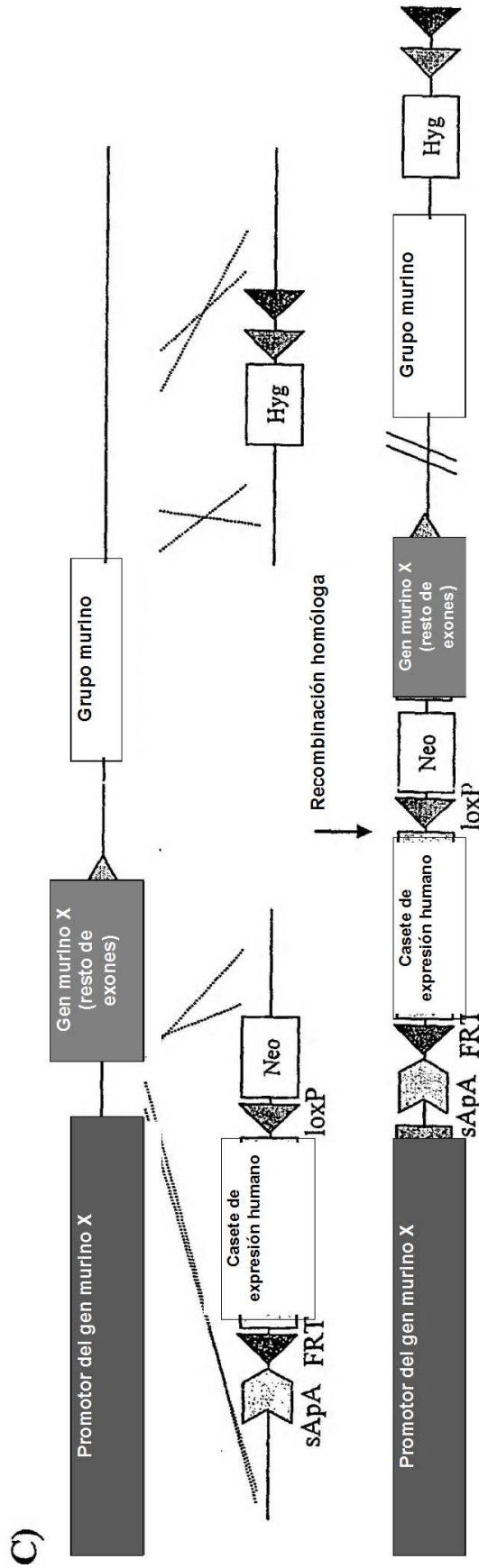
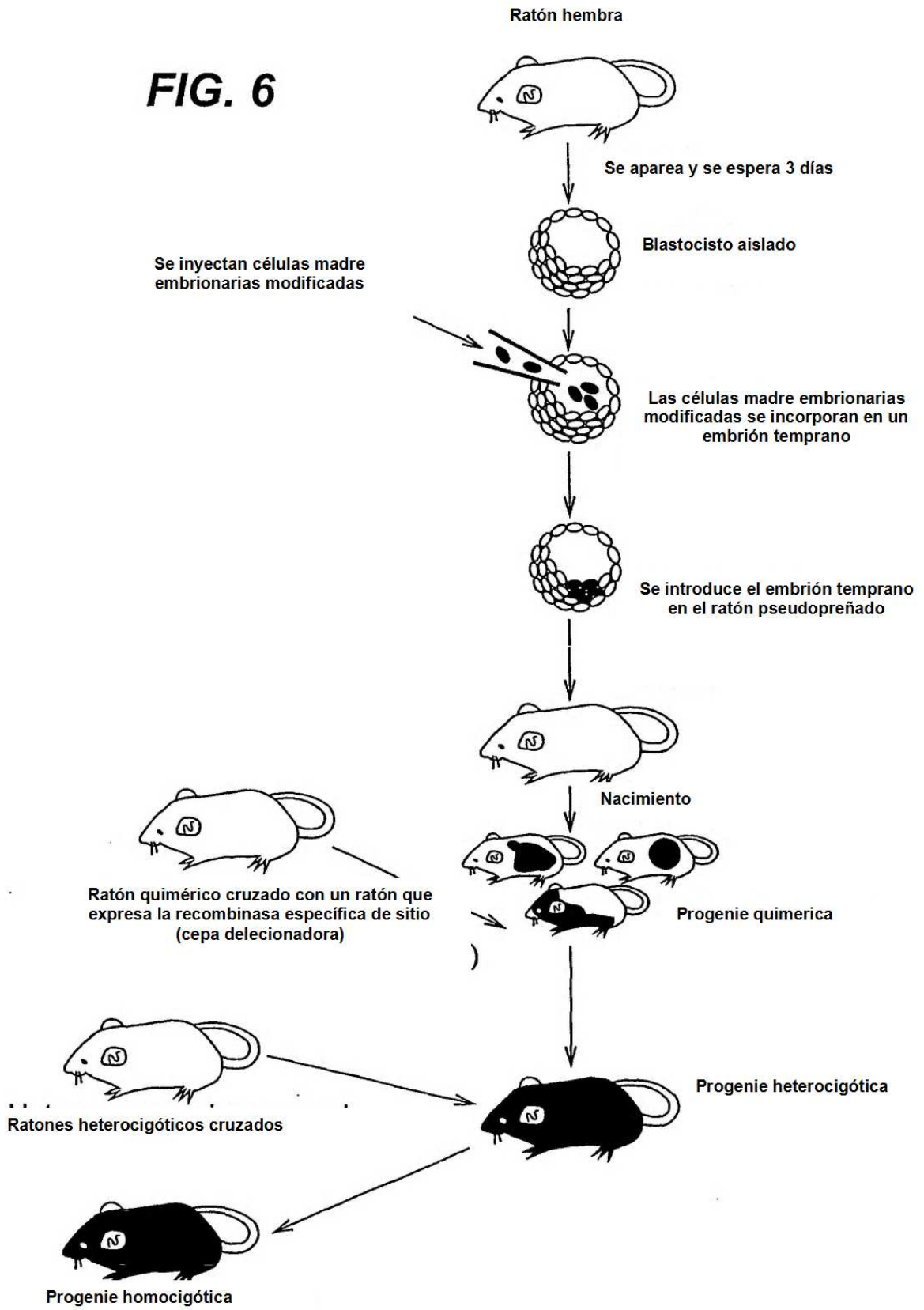


Figura 5

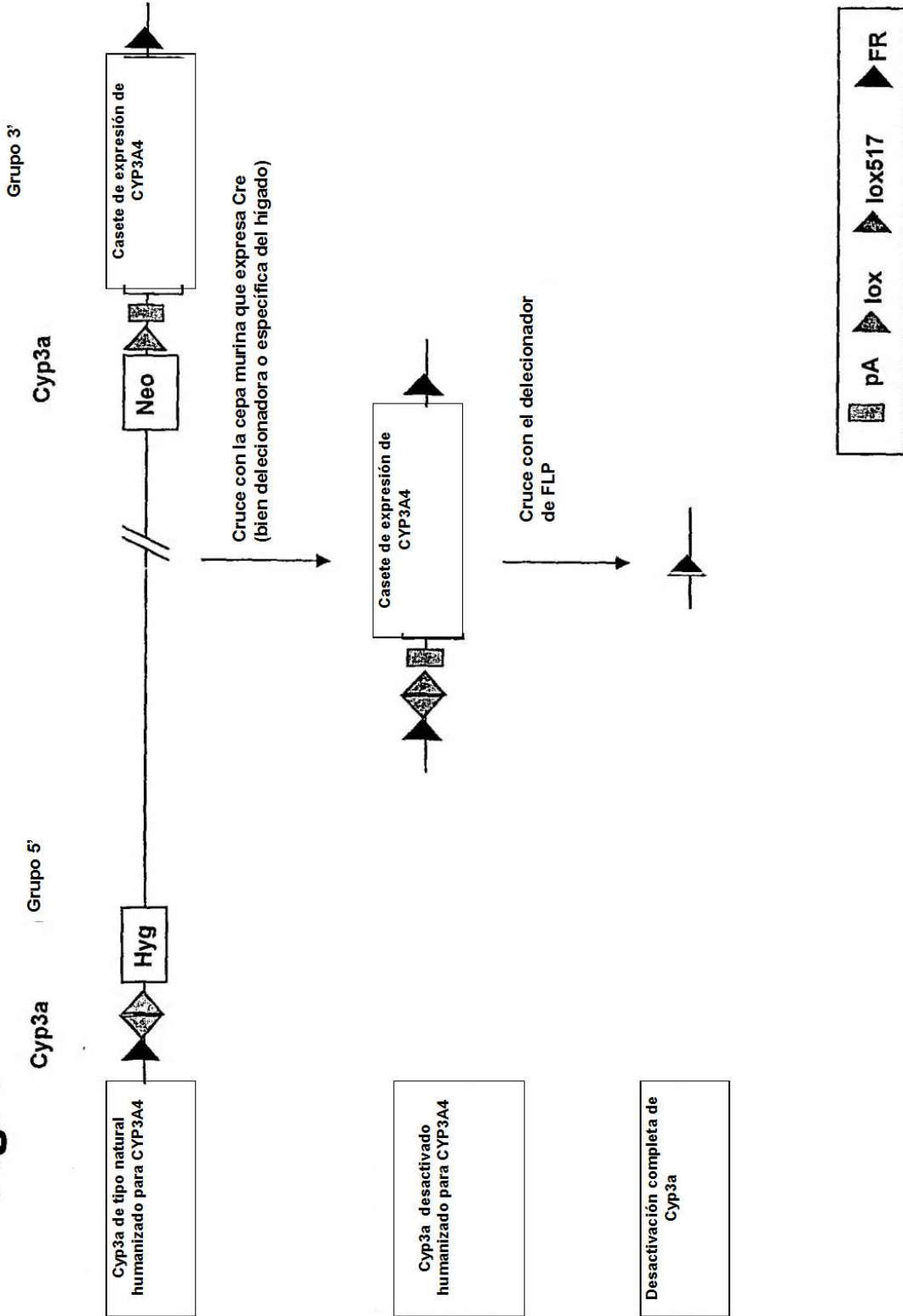




**FIG. 6**



**Fig. 7**





**Fig. 8**

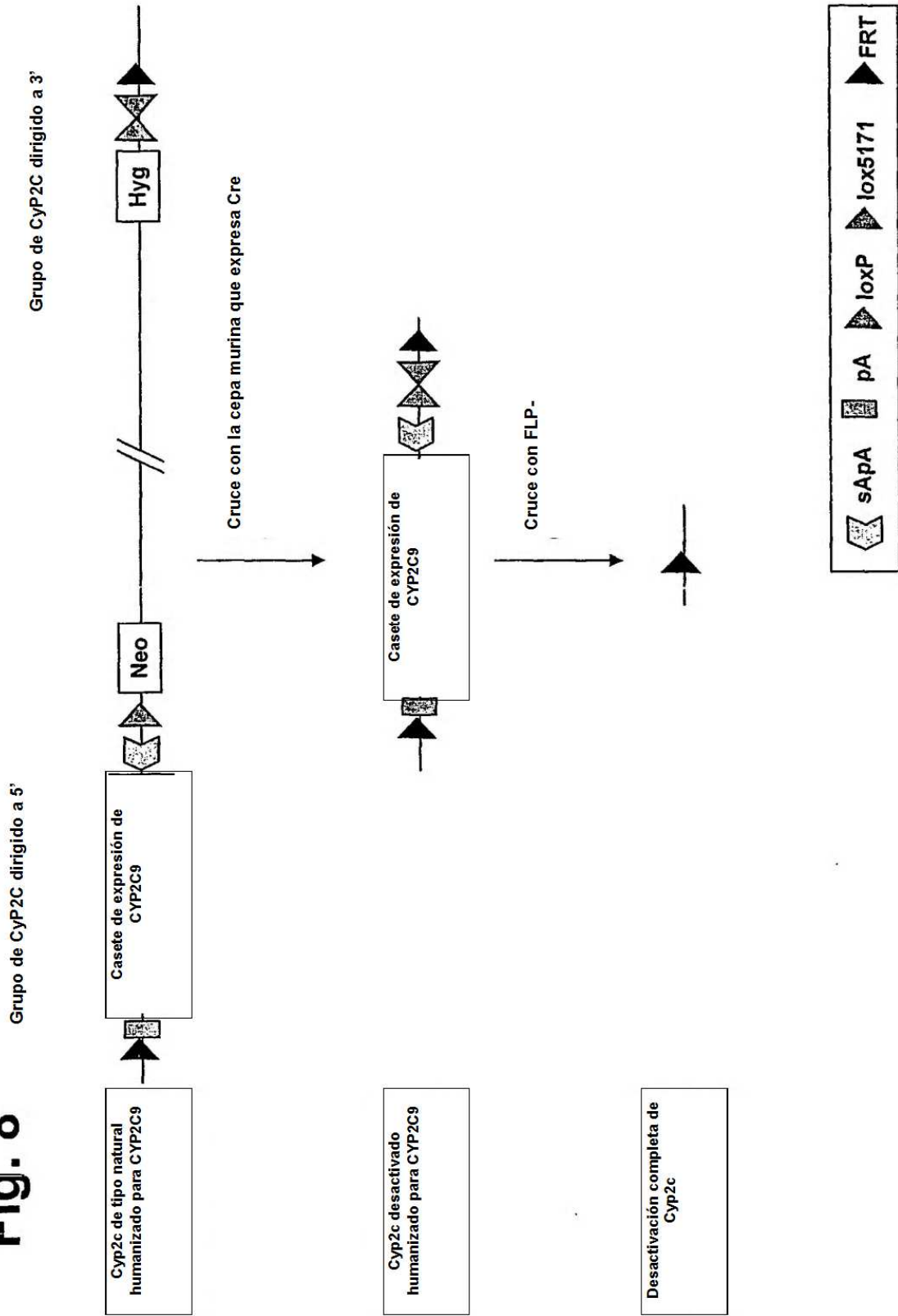
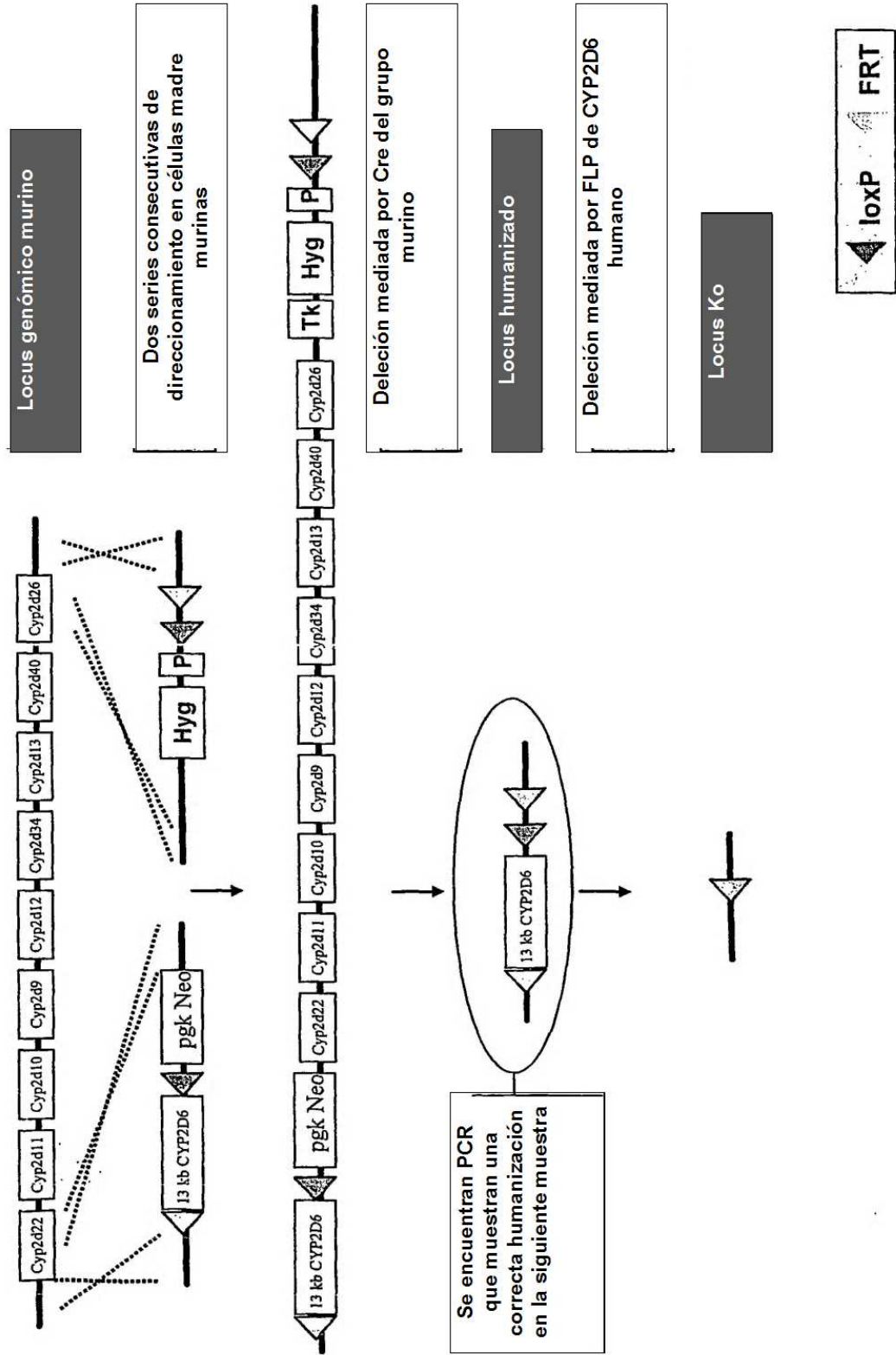
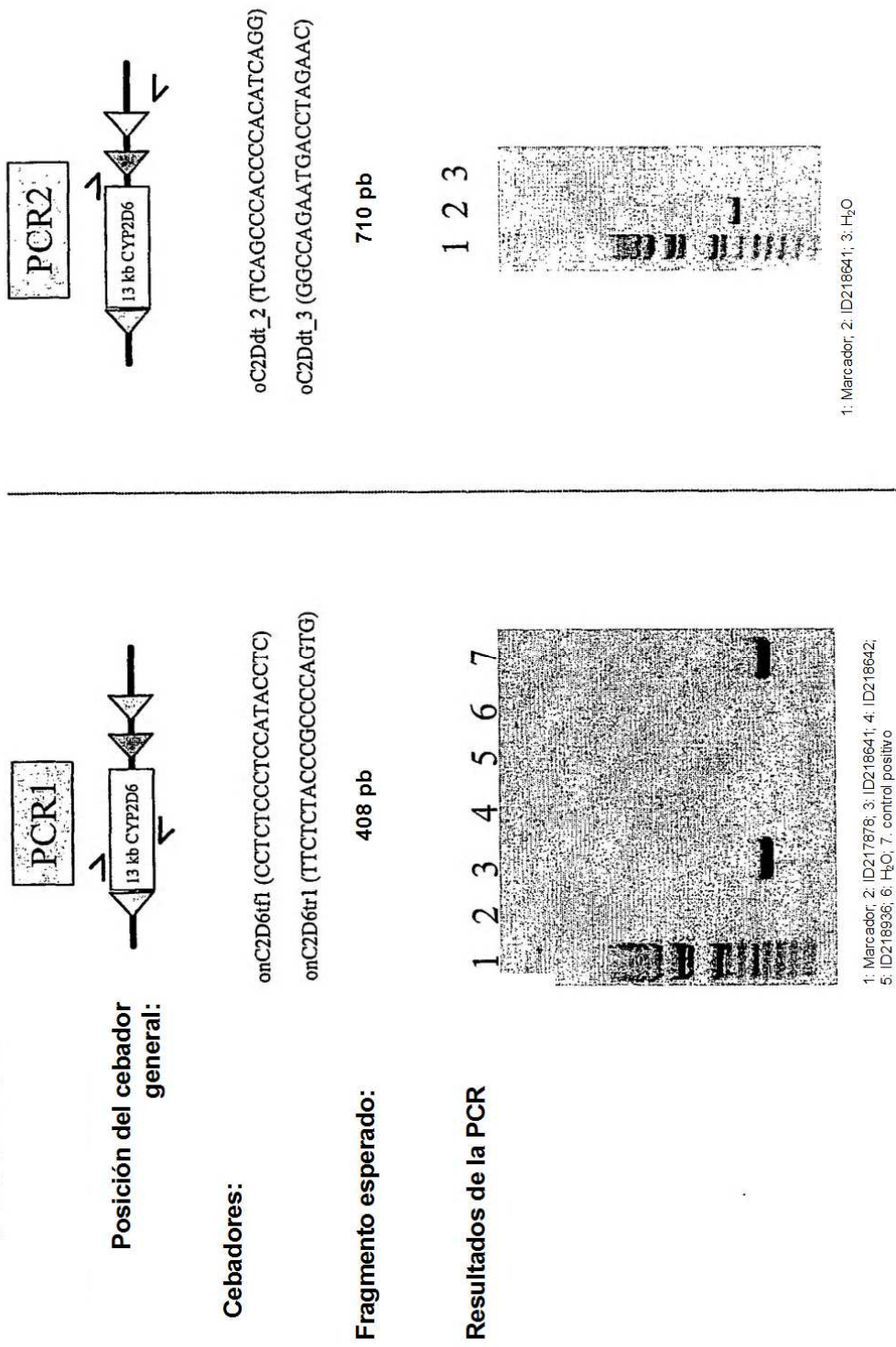


Figura 9

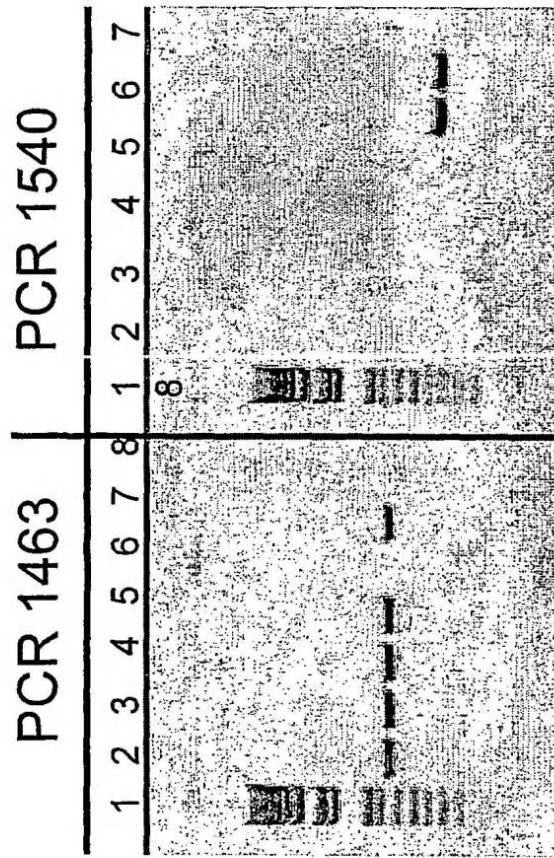


**FIG. 10A**



**Conclusión: el ratón con ID 218641 está humanizado heterocigóticamente para CYP2D6**

**Figura 10B**



1: Marcador; 2: f224504; 3: m225938; 4: m225939; 5: 225944; 6: H<sub>2</sub>O; 7: control positivo; 8: ADN de tipo natural de B6  
5: ID218936; 6: H<sub>2</sub>O; 7: pos. control

PCR 1463: el fragmento de 710 pb confirma la delección del grupo murino Cyp2d y la presencia del casete de expresión de CYP2D6 humano.

PCR 1540: el fragmento de 340 pb detecta el alelo de tipo natural del grupo Cyp2d.

**Conclusión:** los ratones con ID 224504, 225938, 225939 y 225944 están homocigóticamente para CYP2D6 y portan una delección del grupo Cyp2d murino.

Figura 10C

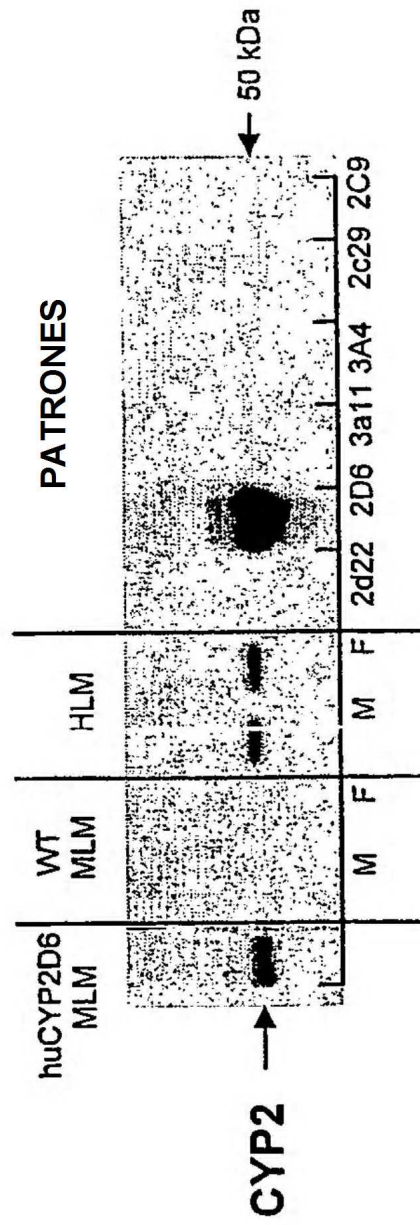


Fig. 11

