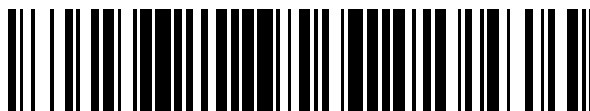


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 545**

51 Int. Cl.:
C12P 21/08 (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04714849 .9**
96 Fecha de presentación: **26.02.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1597382**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.11.2005**

54 Título: **Células y mamíferos no humanos modificados genéticamente**

30 Prioridad:
26.02.2003 GB 0304374

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.08.2012

73 Titular/es:
**Crescendo Biologics Ltd.
Meditrina Building Babraham Research Campus
Babraham Cambridge CB22 3AT, GB**

72 Inventor/es:
BRUGGEMANN, Marianne

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 386 545 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

Células y mamíferos no humanos modificados genéticamente.

La presente invención se refiere a mamíferos no humanos genéticamente modificados, en particular a roedores genéticamente modificados, tales como ratones, que no codifican ningún polipéptido del locus de la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulinas endógeno. La invención también se refiere a células no humanas genéticamente modificadas, en particular células precursoras embrionarias, en especial células de roedor, tales como células de ratón, que no codifican ningún polipéptido del locus de la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulinas endógeno. La invención también se refiere a células no humanas genéticamente modificadas, en particular células precursoras embrionarias, y a los mamíferos no humanos genéticamente modificados producidos a partir de estas, y a su uso para la producción de células y mamíferos no humanos en los que todos los genes de la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulinas endógenos (de $C\mu$ a $C\alpha$) se han delecionado del genoma.

La invención se refiere también a mamíferos no humanos genéticamente modificados, en particular a roedores genéticamente modificados, tales como ratones, en los que la delección de los genes de la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulinas endógenos se ha utilizado para permitir la inserción de otros genes, tales como genes de inmunoglobulinas exógenas o sus segmentos, para asegurar y permitir la expresión de genes específicos del locus de la cadena pesada de inmunoglobulinas. Además, la invención se refiere a la expresión de estos genes producidos por estos mamíferos, y al uso de dichos mamíferos o de sus células para la producción de sistemas inmunológicos modificados con especial énfasis en la producción de inmunoglobulinas o anticuerpos.

Además, la invención se refiere a mamíferos no humanos sin ningún gen de la región constante endógeno cruzados con mamíferos no humanos compatibles capaces de expresar genes de inmunoglobulinas exógenos como entidades redispuestas introducidas o entidades en la configuración de la línea germinal y sobre fragmentos grandes de cromosomas, tales como BAC, YAC y HAC (cromosomas bacterianos, de levadura y humanos artificiales, respectivamente). Los transgenes y los transloci puede ser de ADN humano.

Antecedentes de la invención

La estructura básica de un anticuerpo (inmunoglobulina) es una unidad de cuatro polipéptidos, formada por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras que están unidas mediante enlaces disulfuro intercatenarios. Cada cadena está formada por una región constante y una región variable; V_L y C_L son los términos genéricos para estas regiones sobre la cadena ligera, y V_H y C_H especifican las regiones variable y constante de la cadena pesada. En un anticuerpo convencional, cada par de cadenas pesadas es idéntica, al igual que cada par de cadenas ligeras.

Las inmunoglobulinas (Ig) se agrupan en clases o isotipos (haciendo referencia a la región constante) basándose en la estructura de su región constante de cadena pesada (C_H). En seres humanos y ratones existen cinco clases: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Otras subclases en seres humanos son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, y en ratones IgG1, IgG3, IgG2a e IgG2b. El isotipo es definido por los diferentes genes C (μ , δ , γ , ϵ , α) que son característicos de cada especie de mamífero concreta y que están presentes en todos los miembros de esa especie. Sin embargo pueden existir diferencias, habitualmente mutaciones puntuales o pequeños cambios, en los genes de inmunoglobulinas dentro de los miembros de una especie (por ejemplo, ratones BALB/c frente a ratones C57/Bl6). Estas diferencias definen los determinantes alotípicos. Los determinantes alotípicos se encuentran en las inmunoglobulinas (Ig) de algunos, pero no todos los miembros de una especie concreta (por ejemplo, *Mus musculus*). Los determinantes alotípicos reflejan el polimorfismo genético de la región constante de cadena pesada de Ig dentro de una especie, y se han utilizado como marcadores genéticos. Se han generado anticuerpos que permiten el reconocimiento de los determinantes isotípicos inyectando inmunoglobulinas de una especie en otra especie (por ejemplo, IgM humana en un ratón) o entre miembros de una especie, que permiten producir anticuerpos antialotípicos (IgM^a de BALB/c en C57/Bl6 que forman IgM^b).

Las regiones constantes de cadena ligera existen en formas isotípicas conocidas como kappa (κ) y lambda (λ), y estas cadenas ligeras pueden asociarse potencialmente con todos los isotipos de cadena pesada. Las cadenas ligeras en un anticuerpo concreto son idénticas, y así las inmunoglobulinas tienen cadenas ligeras κ o λ , pero no cadenas ligeras mixtas, a menos que el anticuerpo haya sido modificado de modo artificial.

Los determinantes idiotípicos existen como resultado de estructuras exclusivas generadas por las subregiones hipervariables (o regiones determinantes de la complementariedad, CDR) en las regiones variables de cadena ligera (L) y pesada (H), y se han identificado mediante la variabilidad de secuencia.

Se han desarrollado técnicas para la producción de anticuerpos monoclonales utilizando células derivadas de animales de laboratorio pequeños, tales como ratones (Köhler, G. y Milstein, C., "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity", Nature, 256, 495-497 (1975)), que por primera vez describieron la producción de anticuerpos monoclonales condensando una célula que forma un anticuerpo individual con una célula tumoral de célula B para producir un clon de células en constante división (línea celular de hibridoma) dedicado a fabricar un anticuerpo concreto (anticuerpo monoclonal).

Un anticuerpo monoclonal (mAb) tiene la capacidad de reconocer una estructura o una secuencia definida, o de unirse a un epítipo específico. Por tanto, un anticuerpo monoclonal puede utilizarse exclusivamente para identificar las moléculas que portan el epítipo específico, o puede dirigirse, solo o en combinación con otro resto, a un sitio específico para el diagnóstico o la terapia.

5 El uso de anticuerpos monoclonales como agentes terapéuticos se ha visto restringido por el desarrollo de una respuesta antiinmunoglobulinas en el sujeto tratado. Debido a que la secuencia de la región constante es específica de la especie a partir de la cual se produce el anticuerpo, la introducción de un anticuerpo extraño (xenogéneo o exógeno) en el sistema vascular del hospedante puede producir una respuesta inmunológica. Cuando el anticuerpo xenogéneo se introduce varias veces, por ejemplo en el tratamiento de enfermedades crónicas, resulta poco factible administrar el anticuerpo, puesto que se provocará una respuesta inmunológica y esto dará como resultado la eliminación de la eficacia de diana del anticuerpo administrado generando efectos secundarios extremos, tales como un choque anafiláctico. Por esta razón se han realizado diversos esfuerzos para "humanizar" anticuerpos de roedores que ya se han utilizado con éxito para la intervención terapéutica y, en fechas más recientes, para establecer ratones transgénicos que produzcan anticuerpos totalmente humanos (Brüggemann, M. y Taussig, M.J. (1997), Production of human antibody repertoires in transgenic mice, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 455-458).

La producción de animales transgénicos ha sufrido una revolución debido a las técnicas que permiten cultivar células precursoras embrionarias murinas y a la introducción de modificaciones genéticas en estas células que pueden ser transmitidas a la línea germinal de ratón. Los genes endógenos pueden modificarse, y pueden introducirse genes extraños (exógenos), tales como genes humanos, en un hospedante para proporcionar cepas animales capaces de producir nuevos productos, tales como proteínas de unión xenogéneas (extrañas), en particular inmunoglobulinas.

Como alternativa al uso de bancos artificiales, es posible crear animales transgénicos que porten loci de inmunoglobulinas humanas, en la configuración de la línea germinal, en un entorno genético en el que los loci de Ig endógenos son defectuosos. Se ha realizado la silenciación de genes de inmunoglobulinas mediante la inserción de genes y la eliminación de genes utilizando la introducción de construcciones dirigidas a genes en células precursoras embrionarias (Bot, A., Immunoglobulin deficient mice generated by gene targeting as models for studying the immune response, *Int. Rev. Immunol.*, 13, 327-340, 1996; Loffert *et al.*, Early B-cell development in the mouse: insights from mutations introduced by gene targeting, *Imm. Rev.*, 137, 135-153, 1994). En estos animales se ha demostrado que los loci introducidos pueden reemplazar la función de los genes silenciados; aquellos son expresados y, para genes de inmunoglobulinas, son redispuestos con una eficacia similar a la de los genes silenciados.

La ontogenia de los linfocitos B es iniciada por una redistribución del ADN y la expresión en la superficie de IgH. En la etapa temprana de la diferenciación, la cadena H μ se asocia como un preBCR (receptor de células B) con la cadena L sustituta, que consiste en VpreB y $\lambda 5$, que es reemplazada por la cadena L convencional para formar un BCR en la etapa inmadura de las células B. A esto le sigue la expresión de IgM e IgD sobre la superficie celular de una célula B madura con el posterior desarrollo en la periferia de una célula plasmática que segrega anticuerpos en la que C μ ha cambiado a otro gen C, γ , ϵ o α , mientras que mantiene su región V (variable) redistribuida original.

Brüggemann *et al.* (PNAS, 1989, 86:6709-6723) describe la producción de ratones que portan un minilocus de cadena pesada humana con elementos de unión (J), de diversidad (D) y variables (V) de Ig no redispuestos, unidos a un gen μ constante de cadena pesada humana, que codifica el isotipo de inmunoglobulina IgM. Los genes de inmunoglobulina extraños (humanos) se insertan en la línea germinal de los ratones transgénicos, con el resultado de que la inserción extraña está presente además de los genes Ig endógenos. En estos ratones, los genes extraños pueden redisponearse para codificar un repertorio de inmunoglobulinas del isotipo IgM.

El trabajo de Brüggerman *et al.* (*ibid*) también se describe en la patente de EEUU n° 5.545.807, que se refiere a un método para producir una inmunoglobulina obtenida a partir de células o fluidos corporales de un animal transgénico que tiene insertado en su línea germinal un material genético que codifica al menos parte de una inmunoglobulina de origen extraño, o que puede redisponearse para codificar un repertorio de inmunoglobulinas. En estos textos, se sugiere que "puede resultar conveniente utilizar un animal hospedante que inicialmente no porte material genético que codifique regiones constantes de inmunoglobulinas, de modo que el animal transgénico resultante sólo utilizará el material genético extraño insertado cuando produzca las inmunoglobulinas. Esto puede lograrse utilizando un mutante natural que carezca del material genético pertinente, o fabricando mutantes de modo artificial, por ejemplo, en líneas celulares que en último término crean un hospedante del que se ha eliminado el material genético pertinente." Sin embargo, no se sugiere la forma de proporcionar este animal hospedante deficiente en IgC, y las indicaciones se centran sólo en la inserción de material genético humano; no se ofrecen ejemplos en los que la región constante de cadena pesada de Ig endógena se deleccione.

55 Las alteraciones dirigidas se han centrado en genes de la región C individuales, pero la eliminación de C μ , C δ p C ϵ no ha alterado significativamente el avance en el desarrollo de células B [1-3]. Parece que la silenciación de genes C individuales o la sustitución [4,5] tiene poco efecto sobre el avance del desarrollo, debido a su redundancia funcional. De modo similar, aunque la eliminación de la región potenciadora E μ reduce la redistribución del ADN [6,7] y la sustitución del potenciador $\alpha 3'$ afecta a la conmutación [8], estas son sólo pequeñas perturbaciones casi

insignificantes en el desarrollo inmunológico.

Se ha logrado evitar el uso de los genes de la región C de la cadena H con un posterior bloqueo en el desarrollo de células B mediante dos estrategias opuestas. La eliminación de los segmentos J(uni3n)H elimina la redistribuci3n de D(diversidad)-J [9,10] y los ratones no tienen células B Ig⁺, pero siguen desarrollando precursores de células B B220⁺ presentes a niveles algo reducidos.

El documento EP 0 463 151 describe ratones en los que un fragmento de 2,3 kb del locus de cadena pesada de rat3n end3geno, que porta los genes D y J1-4, se ha eliminado y reemplazado (mediante recombinaci3n hom3loga) por un gen de resistencia a la neomicina. Los genes C de IgH de rat3n end3genos est3n presentes en el rat3n, pero debido a que los genes D y J est3n ausentes, la redistribuci3n de los locus no puede realizarse y se bloquea la expresi3n de los genes C de IgH end3genos, evitando la producci3n de un mensaje funcional que codifica una subunidad C de IgH.

Kitamura *et al.* [11] (Nature, 1991, 350:423-426) describe la producci3n de ratones con una regi3n C μ alterada (ratones μ MT). Esto se logra mediante la localizaci3n g3nica, en la que un fragmento gen3mico de 9 kb de C μ y C δ que porta un cod3n de fin y flanqueado por un gen de resistencia a la neomicina 5' y un gen tk de HSV 3', se inserta en los exones de membrana de C μ utilizando células precursoras embrionarias. Las células ES se utilizaron para generar animales quim3ricos, que se sangraron para obtener ratones heterocig3ticos y despu3s homocig3ticos para la regi3n C μ alterada. Los ratones homocig3ticos para el ex3n transmembrana de C μ alterado eran deficientes en Ig. El desarrollo de células B depende de la expresi3n de μ superficial en la etapa de prec3lulas B, pero debido a que la expresi3n de μ superficial no se produce en ratones con la regi3n C μ alterada (mutaci3n μ MT), el desarrollo de células B se detiene en la etapa de la maduraci3n de prec3lulas B y, por tanto, no se producen células B secretoras de anticuerpos o maduras.

En las l3neas con regiones JH eliminadas o con el ex3n C μ alterado, se produce alguna redistribuci3n de la cadena L, y tambi3n parece que los animales con un ex3n transmembrana C μ alterado cruzados hasta la homocigosidad en diferentes razas de ratones pueden superar en gran medida el bloqueo en la expresi3n de Ig. Esto resulta particularmente pronunciado en el entorno Balb/c, que revela una expresi3n de IgG, IgA e IgE en animales inactivados homocig3ticos [12,13], mientras que en el entorno original de C57BL/6 s3lo se expresa IgA selectivamente, lo cual se ha interpretado como un resto de un sistema inmunol3gico antiguo quiz3s m3s primitivo [14].

Se desean producir mam3feros no humanos gen3ticamente modificados, por ejemplo roedores, tales como ratones, en los que los genes de IgH end3genos han sido silenciados, o eliminados, para producir anticuerpos de origen extra3o, expresados a partir de los genes introducidos.

Se han utilizado una serie de estrategias para silenciar (es decir, alterar) o eliminar un 3nico gen de Ig end3geno, combinadas con la introducci3n simult3nea de un gen humano ex3geno.

Pluschke *et al.* (J. Immunol. Methods, 1998, 215(1-2):27-37) utilizan una estrategia de localizaci3n g3nica (Stief *et al.*, J. Immunol., 1994, 152:3378) en células precursoras embrionarias para sustituir el segmento g3nico gamma 2a constante de IgH de rat3n (C γ 2a) por el segmento g3nico gamma 1 constante de IgH humano (C γ 1); adem3s de esto, se generaron células ES en las que el segmento g3nico kappa de IgL de rat3n se reemplaz3 por su hom3logo humano. Las células ES se utilizaron para generar ratones quim3ricos.

Zou *et al.* (Science, 1993, 262, 1271-1274) describen un sistema de recombinaci3n Cre-*loxP* que funciona en células de mam3fero y que se ha utilizado para la experimentos de localizaci3n g3nica en el rat3n para generar deleciones "limpias" de genes diana en la l3nea germinal, as3 como para inactivar genes de una manera condicional (bas3ndose en la expresi3n regulada de la recombinasa Cre).

Cre es una prote3na recombinasa de 38 kDa del bacteri3fago P1 que media en la recombinaci3n espec3fica de sitio intramolecular (excisiva o inversional) e intermolecular (integrativa) entre los sitios *loxP*; para un an3lisis del sistema, véase Sauer, en Methods of Enzymology, 1993, vol. 2215, 890-900. Un sitio *loxP* (el locus del entrecruzamiento) consiste en dos repeticiones invertidas de 13 pb separadas por una regi3n espaciadora asim3trica de 8 pb. Una mol3cula de Cre se une por repetic3n invertida, o dos mol3culas de Cre se alinean en un sitio *loxP*. La recombinaci3n se produce en la regi3n espaciadora asim3trica. Estas 8 bases tambi3n son responsable de la direccionalidad del sitio. Dos secuencias *loxP* en la orientaci3n opuesta entre s3 invierten el trozo de ADN intermedio, y dos sitios en orientaci3n directa dictan la excisi3n del ADN intermedio entre los sitios, dejando un sitio *loxP* detr3s. Esta eliminaci3n precisa de ADN puede utilizarse para eliminar genes (delecci3n de genes) o para activar genes. El sistema Cre-*loxP* tambi3n puede utilizarse para introducir genes (introducci3n de genes). Un gen flanqueado por dos sitios *loxP* en una orientaci3n directa se denomina un "gen floxeado".

Zou *et al.* (Current Biology, 1994, 4(12):1099-2003) describen el uso del sistema Cre-*loxP* en células precursoras embrionarias de rat3n para sustituir el gen C γ 1 de rat3n, que codifica la regi3n constante de la cadena pesada de anticuerpos IgG1, por el correspondiente gen C γ 1 humano. Se gener3 una construcci3n de transporte dirigido en la que el sitio *loxP* se clon3 en el extremo 3' de la secuencia g3nica diana (en este caso el C γ 1 de rat3n) y, en la

posición 5' del gen diana, se realizó una inserción (de 5' a 3') de un gen mutante de interés (en este caso C γ 1 humano), un sitio *loxP*, un marcador de selección negativo (tk de HSV) y un marcador de selección positivo (*neo^r*). En esta construcción, los sitios *loxP* están en la orientación directa. La construcción de transporte dirigido se introdujo mediante transfección en células ES, y los transformantes se seleccionaron en G418 mediante la resistencia a la neomicina. Se introdujo una construcción Cre en las células transformadas para lograr la expresión transitoria de Cre. La recombinación, es decir, la excisión de la secuencia entre los dos sitios *loxP* (que codifican tk de HSV, *neo^r* y el gen diana C γ 11 de ratón endógeno), sólo se produce en las células que expresan la recombinasa Cre. La secuencia C γ 1 humana se sitúa fuera de los sitios *loxP*, y así permanece insertada dentro del genoma de ratón. Se empleó una selección negativa con aciclovir o ganciclovir para identificar las células en las que se ha producido la delección, puesto que sólo las células que no expresan tk de HSV, es decir, aquellas en las que el gen C γ 1 de ratón endógeno también ha sido delecionado, son capaces de sobrevivir en estos medios.

Por tanto, Zou *et al.* (1994) emplean el sistema Cre-*loxP* para introducir un gen C γ 1 humano y después delecionar un solo gen de la región constante de cadena pesada de Ig endógeno, C γ 1. Los exones que codifican las porciones transmembrana y citoplásmica del C γ 1 de ratón de IgH no fueron sustituidos por secuencias humanas, y se mantuvieron para minimizar el riesgo de alterar la expresión en la membrana y la señalización de la IgG1 humanizada en el ratón. El gen C γ 1 humano introducido se transmitió a través de la línea germinal de ratón, y los ratones mutantes resultantes se cruzaron con ratones que expresan cadenas ligeras kappa con una región constante humana, en lugar de ser de ratón. Los ratones homocigóticos para ambas inserciones producen anticuerpos IgG1 que portan cadenas kappa humanizadas.

Nicholson *et al.* (J. Immunol., 1999, 6888-6906) produjeron ratones que portan transloci de cadena ligera κ y λ y pesada de Ig humana basados en YAC en un entorno en el que los loci de Ig κ e IgH endógenos han sido inactivados. La inactivación del locus IgH se logró utilizando los ratones C μ (mutante μ MT) descritos por Kitamura (1991), *supra*. La expresión de Ig κ fue alterada por la inserción de un módulo Neo en el gen C κ (Zou *et al.*, Eur. J. Immunol., 1995, 25, 2154).

Un problema técnico tratado por esta invención es la producción de un mamífero no humano que es incapaz de expresar ninguno de sus genes C de IgH endógenos, y por tanto es inmunodeficiente. Un problema particular tratado por la presente invención es la producción de un roedor, en particular un ratón, que es incapaz de expresar ninguno de sus 8 genes C de IgH endógenos. Para lograr esto, es necesario generar un mamífero no humano mutante, en particular un roedor, tal como un ratón, en el que los genes de la región constante de cadena pesada endógenos ya no están presentes o no son funcionalmente activos.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un mamífero no humano genéticamente modificado, o una célula de mamífero no humano genéticamente modificada, que se caracteriza porque no comprende una secuencia de ácido nucleico que en sí misma codifique cualquiera de los polipéptidos del locus de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulinas endógenos, y porque están presentes las secuencias de ácidos nucleicos de una o más regiones variables de IgH endógenas, de uno o más segmentos D de IgH endógenos, y de uno o más segmentos J de IgH endógenos.

La presente invención también proporciona un mamífero no humano genéticamente modificado, o una célula de mamífero no humano genéticamente modificada, que se caracteriza porque no comprende una secuencia de ácido nucleico que en sí misma codifique cualquiera de los polipéptidos del locus de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulinas endógenos, y porque están presentes todas las secuencias de ácidos nucleicos de la región variable y los segmentos D y J de IgH endógenas.

Los inventores también describen un ratón transgénico o genéticamente modificado, en el que las células germinales no tienen el locus del gen C de inmunoglobulinas endógeno. También describen un ratón transgénico genéticamente modificado o su progenie, en el que las células somáticas y germinales no tienen el locus del gen C de inmunoglobulinas endógeno.

En un aspecto de la invención, la célula o el mamífero no humano genéticamente modificado de la invención no comprende una secuencia de ácido nucleico que en sí misma codifique cualquiera de los polipéptidos del locus de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulinas. En las células y los mamíferos no humanos genéticamente modificados de la invención, todas las secuencias de genes de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (C de IgH) están ausentes o parcialmente ausentes del genoma. Preferiblemente, cada uno de los genes de la región C de IgH endógenos están ausentes; más preferiblemente, la región C endógena completa (de C μ a C α) está ausente.

En la presente, endógeno se define como auténtico, nativo, no extraño y no modificado por ingeniería genética, tal como localización génica o introducción de genes.

Las células o los mamíferos no humanos genéticamente modificados pueden obtenerse mediante la delección dirigida de todas o fundamentalmente todas las secuencias del gen C de IgH endógenas. La delección puede ser de todos los genes de la región C de IgH endógenos y las secuencias intermedias (delección limpia o eliminación completa de

exones/intrones) o de fundamentalmente todas las secuencias de C de IgH endógenas mediante la delección de un parte extensa de la secuencia del gen de la región C de IgH endógena, de modo que se evita la expresión de cualquier gen C de IgH. La delección dirigida puede realizarse mediante un proceso de recombinación-excisión, por ejemplo mediante recombinación Cre-*loxP*. Por tanto, la invención también proporciona un mamífero no humano transgénico o genéticamente modificado, según se describe en la presente, o una célula de mamífero no humano transgénica o genéticamente modificada, preferiblemente una célula precursora embrionaria, según se describe en la presente, que puede obtenerse mediante un método de recombinación específica de sitio, preferiblemente mediante un método de recombinación Cre-*loxP*.

En los métodos de recombinación específica de sitio para la delección dirigida, se escinde una región de secuencia de ácido nucleico flanqueada por dos secuencias de recombinación específica de sitio; tras la excisión, una única secuencia de recombinación específica de sitio permanece en el genoma. Se prefiere que la secuencia de recombinación específica de sitio sea un sitio de recombinación específica de sitio no endógeno (NESSR). Pueden utilizarse varios métodos para producir una célula de mamífero no humano en el que la secuencia diana para la delección, es decir, el locus C de IgH endógeno, está flanqueada por sitios NESSR. En uno de estos métodos, los sitios NESSR están secuencialmente integrados en el genoma de una célula de mamífero no humano, preferiblemente una célula precursora embrionaria, de forma que un sitio NESSR primero se introduce en una célula y se integra en un extremo de la secuencia diana, y después un sitio NESSR se introduce y se integra en el otro extremo de la secuencia diana. En un método alternativo, los sitios NESSR se introducen simultáneamente en la célula para su integración en cada extremo de la secuencia diana. Las células con un sitio NESSR en uno u otro extremo de la secuencia diana pueden utilizarse para producir mamíferos no humanos genéticamente modificados con secuencias NESSR presentes dentro del genoma en uno u otro extremo de la secuencia diana. Un mamífero no humano que tenga un único sitio NESSR en un extremo de la secuencia diana del locus C de IgH puede cruzarse con un mamífero no humano que tenga un sitio NESSR en el otro extremo de la secuencia diana del locus C de IgH, para producir una progenie con sitios NESSR que flanquean la secuencia diana. Las células con sitios NESSR flanqueando la secuencia diana del locus C de IgH pueden utilizarse para producir mamíferos no humanos genéticamente modificados con secuencias NESSR presentes dentro del genoma que flanquean el locus C de IgH endógeno.

La presente invención proporciona una célula o un mamífero no humano genéticamente modificado que tiene al menos una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena presente dentro del genoma cadena abajo o dentro del último gen del locus C de IgH y/o cadena arriba o dentro del primer gen del locus C de IgH. En una realización preferida, dos sitios NESSR, preferiblemente sitios *loxP*, se integran dentro del genoma cadena abajo o dentro del último gen del locus C de IgH, y cadena arriba o dentro del primer gen del locus C de IgH.

Un sitio NESSR puede estar presente cadena arriba en una posición adyacente al primer gen del locus C de IgH y/o cadena abajo en una posición adyacente al último gen del locus IgH. "Adyacente" significa que el sitio NESSR está colocado 5' o 3' del inicio del primer gen, o al final del último gen del locus C de IgH. Esto implica que el primer o el último gen del locus C de IgH es la región codificadora más cercana al NESSR.

La invención proporciona un mamífero no humano genéticamente modificado, o una célula de mamífero no humano genéticamente modificada, según se describe en la presente, que tiene sitios NESSR, que son preferiblemente sitios *loxP*, que flanquean los genes de la región C de IgH, o insertados en los genes a cada extremo de los genes de la región C de IgH.

La invención proporciona un mamífero no humano genéticamente modificado, o una célula de mamífero no humano genéticamente modificada, en el que los genes C de IgH endógenos están ausentes, según se describe en la presente, y un sitio de recombinación específica de sitio no endógeno (NESSR) está presente dentro del genoma, preferiblemente el sitio de recombinación específica de sitio no endógeno es un sitio de recombinación *loxP*.

Se prefiere que los genes C de IgH endógenos estén delecionados, pero al menos parte de al menos una secuencia potenciadora de C de IgH endógena se mantenga. Esto tiene la ventaja de mejorar la expresión de genes extraños cuando se insertan en el locus y permite la regulación específica de locus de los genes introducidos de manera específica de sitio (por ejemplo, utilizando una inserción Cre-*loxP* que emplea el sitio *loxP* remanente en la agrupación de genes C de IgH delecionados). La retención de al menos parte de la secuencia potenciadora J-C-intrónica endógena y/o al menos parte de la secuencia potenciadora $\alpha 3'$ se prefiere particularmente.

En una célula o un mamífero no humano genéticamente modificado de la invención, están presentes las secuencias de ácidos nucleicos de una o más regiones variables y de los segmentos D y/o J de IgH endógenas. En una realización se prefiere particularmente que estén presentes las secuencias de ácidos nucleicos de la región variable y de los segmentos D y J de IgH endógenas.

En una realización alternativa, una región variable exógena, preferiblemente una región variable de mamífero, más preferiblemente una región variable humana, está presente.

Una célula o un mamífero no humano genéticamente modificado de la invención puede comprender uno o más marcadores seleccionables integrados dentro del genoma.

Un marcador seleccionable puede estar colocado cadena arriba o cadena abajo de una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena. Al menos un marcador seleccionable puede estar integrado dentro del genoma cadena arriba y/o cadena abajo de al menos una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena.

5 En una realización preferida, la invención proporciona un mamífero no humano genéticamente modificado, o una célula de mamífero no humano genéticamente modificada, que tiene un marcador seleccionable integrado cadena arriba o cadena abajo del primer y/o del último gen C de IgH endógeno y/o cadena arriba o cadena abajo de una secuencia *loxP*.

10 El marcador seleccionable es preferiblemente uno o más de un gen de resistencia a la neomicina; un gen de resistencia a la puromicina; un gen de higromicina. El marcador seleccionable puede ser un gen de timidina quinasa del virus del herpes simplex.

Un mamífero no humano genéticamente modificado, o una célula de mamífero no humano genéticamente modificada, según se describe en la presente, puede tener un marcador seleccionable diferente integrado en cada extremo de la región C de IgH.

15 Por tanto, un mamífero no humano o una célula de mamífero no humano, tal como una célula de roedor, por ejemplo una célula de ratón, en particular una célula precursora embrionaria de ratón, puede no tener el locus de cadena pesada de inmunoglobulinas endógeno, y puede comprender uno o más genes que codifican un marcador seleccionable.

20 Un mamífero no humano genéticamente modificado de la invención puede ser un mamífero roedor, murino, ovino, porcino, equino, canino, felino o similares, pero preferiblemente es roedor, más preferiblemente murino, lo más preferiblemente un ratón. Una célula de mamífero no humano genéticamente modificada de la invención puede ser una célula precursora embrionaria o un oocito; y preferiblemente es una célula de roedor, murina, ovina, porcina, equina, canina, felina o similares, preferiblemente una célula de roedor, más preferiblemente una célula murina, lo más preferiblemente un célula de ratón. Los ratones son particularmente preferidos porque su repertorio inmunológico es extenso y son fáciles de manipular y criar.

25 La presente invención proporciona un ratón o una célula de ratón genéticamente modificado en el que los 8 genes de inmunoglobulina de la región constante de cadena pesada endógenos (μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$, ϵ y α) están ausentes o parcialmente ausentes hasta el punto de no ser funcionales, o en el que los genes δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$ y ϵ están ausentes y los genes flanqueantes μ y α están parcialmente ausentes hasta el punto de no ser funcionales, o en el que los genes μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$ y ϵ están ausentes y α está parcialmente ausente hasta el punto de no ser funcional, o en el que δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$, ϵ y α están ausentes y μ está parcialmente ausente hasta el punto de no ser funcional.

30 Parcialmente ausente significa que la secuencia del gen de la región constante de IgH endógena ha sido delecionada o alterada hasta el punto de que ningún producto génico de C de IgH endógeno funcional es codificado en el locus C de IgH, es decir, ningún producto génico de C de IgH endógeno funcional puede expresarse desde el locus.

La presente invención proporciona también una célula precursora embrionaria (ES) de mamífero no humano que se caracteriza porque los genes de la región constante de cadena pesada de Ig endógenos están ausentes o parcialmente ausentes. Preferiblemente, todos los genes de la región C de IgH endógenos están ausentes; más preferiblemente todos los genes C de IgH endógenos conocidos están ausentes.

40 En una realización preferida, la célula ES es un mutante de deleción de una célula precursora embrionaria de ratón en el que los 8 genes de inmunoglobulina de la región constante de cadena pesada endógenos μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$, ϵ y α están ausentes o parcialmente ausentes hasta el punto de no ser funcionales, o en el que los genes δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$ y ϵ están ausentes y los genes flanqueantes μ y α están parcialmente ausentes hasta el punto de no ser funcionales, o en el que los genes μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$ y ϵ están ausentes y α está parcialmente ausente hasta el punto de no ser funcional, o en el que δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$, ϵ y α están ausentes y μ está parcialmente ausente hasta el punto de no ser funcional.

50 El mutante de deleción de un mamífero no humano, preferiblemente un roedor, más preferiblemente un ratón, puede cruzarse con un mamífero no humano compatible que sea capaz de expresar uno o más genes C de IgH funcionalmente activos, preferiblemente uno o más genes C de IgH humanos funcionalmente activos, por ejemplo, un mutante de deleción de un ratón puede cruzarse con un ratón capaz de expresar uno o más genes C de IgH humanos funcionalmente activos. La progenie heterocigótica (F1) de este cruzamiento puede cruzarse entre sí para producir una progenie heterocigótica y homocigótica (F2) de un mamífero no humano, preferiblemente un ratón, que no sea capaz de expresar los genes C de IgH endógeno pero que sí sea capaz de expresar sólo un gen o genes C de IgH extraños, preferiblemente humanos.

55 Tal como se observa en otras razas de ratones con inactivación de Ig que expresan transgenes de Ig, la presencia de genes C de ratón puede dar como resultado la producción de cadenas de Ig quiméricas de humano (es decir,

extraño)-ratón mediante mecanismos de transconmutación o transcorte y empalme que juntan segmentos génicos que están sobre diferentes localizaciones cromosómicas (analizado en Brüggemann y Taussig, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 455-458, 1997). Por tanto, una ventaja de deleccionar completamente o casi completamente la región del gen C de IgH endógena completa es que, en la progenie F2, que porta y expresa un locus o gen introducido, por ejemplo de IgH exógeno, el locus del gen C de IgH endógeno no puede activarse para producir productos de conmutación o de corte y empalme poco convencionales. Por consiguiente, una ventaja de producir un animal con genes de Ig endógenos silenciados y genes de Ig humanos introducidos es que no pueden producirse moléculas mixtas (por ejemplo, IgH de ratón e IgL humana) y, por tanto, la inmunización de este animal permite la producción de anticuerpos totalmente humanos específicos.

La invención proporciona un método para producir una célula no humana genéticamente modificada que comprende:

(a) (i) transfectar una célula no humana con una construcción de transporte dirigido para la integración cadena arriba o dentro del primer gen C de IgH del locus C de IgH, comprendiendo dicha construcción de transporte dirigido una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena y un marcador seleccionable, seleccionar una célula en la que el marcador seleccionable está presente, y evaluar dicha célula para la integración de la secuencia de recombinación, y

(ii) transfectar una célula producida en (a) (i) con una construcción de transporte dirigido para la integración cadena abajo o dentro del último gen C de IgH del locus C de IgH, comprendiendo dicha construcción de transporte dirigido un marcador seleccionable y una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena, seleccionar una célula en la que el marcador seleccionable está presente, y evaluar dicha célula para la integración de la secuencia de recombinación; o

(b) (i) transfectar una célula no humana con una construcción de transporte dirigido para la integración cadena abajo o dentro del último gen C de IgH del locus C de IgH, comprendiendo dicha construcción de transporte dirigido una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena y un marcador seleccionable, seleccionar una célula en la que el marcador seleccionable está presente, y evaluar dicha célula para la integración de la secuencia de recombinación, y

(ii) transfectar una célula producida en (b) (i) con una construcción de transporte dirigido para la integración cadena arriba o dentro del primer gen C de IgH del locus C de IgH, comprendiendo dicha construcción de transporte dirigido una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena y un marcador seleccionable, seleccionar una célula en la que el marcador seleccionable está presente, y evaluar dicha célula para la integración de la secuencia de recombinación; o

(c) cotransfectar una célula no humana con una construcción de transporte dirigido para la integración cadena arriba o dentro del primer gen C de IgH del locus C de IgH, y con una construcción de transporte dirigido para la integración cadena abajo o dentro del último gen C de IgH del locus C de IgH, comprendiendo cada una de dichas construcciones de transporte dirigido una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena y teniendo cada una un marcador seleccionable, seleccionar una célula en la que el marcador o marcadores seleccionables están presentes, y evaluar dicha célula para la integración de la secuencia de recombinación; y opcionalmente,

(d) proporcionar a una célula obtenida en (a) (ii), (b) (ii) o (c) una recombinasa activa en la secuencia de recombinación específica de sitio no endógena, y evaluar para acontecimientos de deleción.

La recombinasa en la etapa opcional (d) puede ser proporcionada por un vector de expresión, es decir, por la introducción de un vector de expresión en la célula. En un método preferido, la secuencia de recombinación específica de sitio no endógena es un sitio *loxP*, y en la etapa opcional (d), la recombinasa es una recombinasa Cre.

Se prefiere que la célula no humana genéticamente modificada sea una célula precursora embrionaria o un oocito. La célula no humana genéticamente modificada puede ser una célula de roedor, más preferiblemente una célula de ratón.

Puede utilizarse cualquier vector de clonación adecuado para generar la construcción de transporte dirigido, y las estrategias de clonación se describen en Sambrook, Fritsch y Maniatis en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. De manera deseable, la construcción de transporte dirigido puede portar uno o más genes de marcadores; los marcadores adecuados son conocidos, y los que resultan especialmente adecuados son los que permiten una selección positiva. De particular interés es el uso del gen para la neomicina fosfotransferasa ("neo"), que confiere resistencia a G418, y también es adecuado el gen de resistencia a la puromicina ("puro") o el gen de resistencia a la higromicina; se prefieren los genes de resistencia a la neomicina y/o puromicina.

En la construcción de transporte dirigido, cadena arriba y/o cadena abajo del gen diana puede haber un gen que proporciona la identificación de si ha ocurrido un doble entrecruzamiento homólogo (selección negativa). Puede emplearse el gen de la timidina quinasa del virus de herpes simplex (HSV-tk o tk de HSV) como marcador de selección negativa, puesto que las células que producen timidina quinasa pueden ser destruidas por aciclovir o ganciclovir.

Tras haber preparado una construcción de transporte dirigido y haber eliminado cualquier secuencia no deseada, la construcción puede introducirse en la célula diana, por ejemplo una célula ES o un oocito. Puede emplearse cualquier técnica conveniente para introducir el ADN en la célula diana. Para la localización genética convencional (habitualmente con construcciones de hasta 20 kb), el ADN se introduce más habitualmente mediante electroporación (véase Zou *et al.*, Eur. J. Immunol., 25, 2154-2162, 1995), mientras que para modificaciones secundarias, tales como la integración mediada por Cre-*loxP*, la electroporación puede utilizarse para la integración de construcciones más pequeñas y otros métodos, tales como la lipofección y la fusión de células/esferoplastos de levadura para YAC (cromosomas artificiales de levadura) y la transferencia de ADN mediada por fosfato de calcio para fragmentos de cromosomas o cromosomas artificiales de mamífero que permiten la integración de una gama desde varios 100 kb hasta Mb. Por tanto, la electroporación es la técnica preferida para la introducción de pequeños fragmentos de ADN (hasta 50 kb) en la célula diana, y los otros métodos listados son adecuados y quizás ventajosos para la introducción de secuencias de ADN más grandes (>50 kb).

Después de la transformación o la transfección de las células diana, estas pueden seleccionarse mediante marcadores positivos y/o negativos. Tal como se indicó previamente, pueden utilizarse marcadores positivos, tales como genes de resistencia a neomicina y/o puromicina. Las células con el fenotipo deseado después pueden analizarse mediante un análisis de restricción, electroforesis, análisis de la transferencia Southern, PCR o similares.

La PCR también puede utilizarse para detectar la presencia de recombinación homóloga. Pueden emplearse cebadores de PCR que sean complementarios con una secuencia dentro de la construcción de transporte dirigido, y que sean complementarios con una secuencia fuera de la construcción y en el locus diana. Se obtienen moléculas de ADN en la reacción de PCR sólo cuando ambos cebadores son capaces de unirse a la secuencia complementaria, es decir, sólo si se ha producido una recombinación homóloga. La demostración de los fragmentos con el tamaño esperado, verificada mediante secuenciación, apoya la conclusión de que se ha producido la recombinación homóloga.

Aunque la presencia del gen del marcador en el genoma indica que se ha producido la integración, es necesario determinar si se ha producido la integración homóloga. Los métodos para lograrlo son conocidos en la técnica, tales como la utilización de un análisis del ADN mediante una hibridación de transferencia Southern para establecer la localización de la integración. Empleando sondas para el inserto y las secuencias en las regiones 5' y 3' distantes a la región flanqueante en la que se produciría la integración homóloga, puede demostrarse que se ha logrado el transporte dirigido homólogo. Una ventaja es que las sondas externa adyacentes al ADN de localización dirigida y los sitios de restricción recién introducidos, por ejemplo mediante un gen de un marcador seleccionable, pueden utilizarse para la identificación de la alteración introducida por transporte dirigido.

Por tanto, puede utilizarse una selección, preferiblemente mediante PCR, para confirmar la integración de sitios NESSR, tales como sitios *loxP*, en la posición correcta, sobre el mismo alelo y en la orientación correcta (directa) para permitir la eliminación de genes mediante delección. La selección con métodos tales como la PCR también puede utilizarse para detectar acontecimientos de delección.

Una célula precursora embrionaria tal como se describe en la presente, por ejemplo que puede obtenerse mediante el anterior método, puede utilizarse para la producción de un mamífero no humano genéticamente modificado.

Los procesos descritos anteriormente pueden realizarse primero para inactivar los loci de cadena pesada constante en una célula precursora embrionaria, las células después pueden inyectarse en blastocitos del hospedante y desarrollarse para producir un animal quimérico. Los métodos adecuados se describen, por ejemplo, en Hogan *et al.* (Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., y Lacy, E. (1994), *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, NY). Los animales quiméricos se cruzan para obtener hospedantes heterocigóticos. Después, mediante el cruzamiento de los hospedantes heterocigóticos, puede obtenerse un hospedante homocigótico.

Por consiguiente, la invención proporciona un método para producir un mamífero no humano genéticamente modificado que se caracteriza porque una célula precursora embrionaria, tal como se describe en la presente, se introduce en un blastocito hospedante y se desarrolla para producir un animal quimérico.

Esto puede lograrse mediante un método que se caracteriza por:

(a) introducir una célula precursora embrionaria de mamífero no humano, tal como se describe en la presente, en un blastocito de mamífero no humano compatible; y

(b) transplantar el blastocito obtenido en (a) a una madre de acogida que es un mamífero no humano compatible para obtener un mamífero no humano quimérico, y opcionalmente seleccionar el marcador o marcadores seleccionables y/o la secuencia o secuencias de recombinación específica de sitio no endógenas y/o la delección de todas o fundamentalmente todas las secuencias del gen C de IgH endógenas.

Un mamífero no humano quimérico producido mediante estos métodos puede cruzarse para obtener una progenia heterocigótica. La progenie heterocigótica puede cruzarse entre sí para obtener una progenie homocigótica. Por tanto, la invención proporciona un método para producir un mamífero no humano genéticamente modificado. que se

- 5 caracteriza por realizar un método de la invención para obtener un mamífero no humano quimérico y cruzar dicho mamífero no humano quimérico para obtener una progenie heterocigótica. También se proporciona un método para producir un mamífero no humano genéticamente modificado, que se caracteriza por realizar un método de la invención para obtener una progenie heterocigótica y cruzar entre sí dicha progenie heterocigótica para obtener una progenie homocigótica.
- Un método para producir un mamífero no humano genéticamente modificado según la invención puede comprender:
- (a) inyectar un clon de una célula ES de mamífero no humano que tiene dos sitios *loxP* integrados, tal como se describe en la presente, en un blastocito de mamífero no humano;
- 10 (b) transplantar el blastocito en una madre de acogida que es un mamífero no humano compatible para obtener una progenie quimérica de mamíferos no humanos;
- (c) opcionalmente seleccionar para *loxP*;
- (d) cruzar la progenie para obtener un mamífero no humano que tiene dos sitios *loxP* integrados en el mismo alelo;
- (e) cruzar un mamífero no humano que tiene dos sitios *loxP* integrados con un mamífero no humano que expresa Cre compatible;
- 15 (f) seleccionar la progenie para mutantes de delección, preferiblemente mediante PCR; o
- (g) generar mamíferos no humanos genéticamente modificados, por ejemplo ratones, con dos sitios *loxP* integrados en un alelo, o en un locus o en dos alelos o loci distintos, cruzando entre sí los ratones derivados producidos mediante transgénesis o la vía de células ES;
- (h) realizar una delección inter- o intraalélica tras la expresión de Cre.
- 20 La invención también proporciona un método para producir un mamífero no humano genéticamente modificado que se caracteriza por realizar un método de la invención para obtener un mamífero no humano genéticamente modificado homocigótico para la integración de una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena cadena arriba o dentro del primer gen C de IgH del locus C de IgH, y cruzar dicho mamífero no humano genéticamente modificado homocigótico para la integración de una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena cadena arriba o dentro del primer gen C de IgH del locus C de IgH, con un mamífero no humano genéticamente modificado compatible homocigótico para la integración de una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena cadena abajo o dentro del último gen C de IgH del locus C de IgH, para obtener una progenie heterocigótica, y opcionalmente cruzar entre sí la progenie heterocigótica para obtener una progenie homocigótica para ambas integraciones.
- 25 La progenie homocigótica para ambas integraciones puede cruzarse con un mamífero no humano compatible capaz de expresar una recombinasa activa en la secuencia de recombinación específica de sitio no endógena para obtener una progenie con la delección del gen C de IgH, que opcionalmente puede seleccionarse utilizando métodos adecuados para detectar la delección del gen C de IgH.
- 30 La secuencia o secuencias de recombinación específica de sitio no endógenas pueden ser sitios *loxP*, y la recombinasa una recombinasa Cre.
- 35 La progenie heterocigótica u homocigótica para *loxP* en ambos loci puede cruzarse con un mamífero no humano compatible capaz de expresar la recombinasa Cre para obtener una progenie de mamíferos no humanos que no comprenden una secuencia de ácido nucleico que en sí misma codifique cualquiera de los polipéptidos del locus de la región constante de cadena pesada de Ig endógenos en uno o ambos alelos.
- 40 Puede obtenerse un mamífero no humano transgénico capaz de expresar la recombinasa Cre mediante la microinyección de un plásmido Cre linealizado en el pronúcleo masculino de embriones de mamíferos no humanos F1 para producir una raza de mamíferos no humanos que expresan Cre.
- Utilizando los métodos de la invención descritos en la presente puede obtenerse un mamífero no humano genéticamente modificado que no comprenda una secuencia de ácido nucleico que en sí misma codifique cualquiera de los polipéptidos de la región constante de cadena pesada de Ig endógenos. Las secuencias de ácidos nucleicos de una o más regiones variables de IgH endógenas, de uno o más segmentos D de IgH endógenos, y de uno o más segmentos J de IgH endógenos estarán presentes en la progenie, en algunos aspectos todas las secuencias de ácidos nucleicos endógenas de la región variable y del segmento D y J de IgH estarán presentes en la progenie.
- 45 La invención proporciona un método para producir un mamífero no humano genéticamente modificado capaz de expresar uno o más genes exógenos, que se caracteriza por realizar un método de la invención para obtener un mamífero no humano genéticamente modificado de la invención que no comprende una secuencia de ácido nucleico que en sí misma codifique cualquiera de los polipéptidos del locus de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos, y cruzar dicho mamífero no humano genéticamente modificado de la invención que no
- 50

comprende una secuencia de ácido nucleico que en sí misma codifique cualquiera de los polipéptidos del locus de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos, con un mamífero no humano compatible que codifica y es capaz de expresar uno o más genes exógenos, para obtener una progenie heterocigótica para dicho uno o más genes exógenos, y opcionalmente cruzar entre sí la progenie heterocigótica para producir una progenie homocigótica para dicho uno o más genes exógenos.

Un gen exógeno es un gen que es extraño, es decir, no nativo, a la célula o al mamífero no humano hospedante.

Por tanto, la invención puede emplearse para producir un mamífero no humano, que preferiblemente es un roedor, más preferiblemente un ratón, que es capaz de expresar un gen o genes de inmunoglobulina extraños, preferiblemente humanos, cruzando el mamífero no humano genéticamente modificado, según se define en la presente, que no es capaz de expresar genes C de IgH funcionalmente activos (endógenos), con un mamífero no humano compatible, preferiblemente un roedor, más preferiblemente un ratón, que es capaz de expresar uno o más genes C de IgH funcionalmente activos extraños, preferiblemente humanos. Esto permite el intercambio interespecífico de genes/loci para producir una progenie seleccionada (heterocigótica u homocigótica) con uno o más genes funcionalmente activos exógenos, preferiblemente humanos, de los rasgos deseados, en un entorno en que los correspondientes genes del mamífero no humano están silenciados o eliminados.

Se proporciona un método para producir una célula o un mamífero no humano genéticamente modificado capaz de expresar uno o más genes exógenos, que comprende la introducción de uno o más genes exógenos en una célula de mamífero no humano de la invención que no comprende una secuencia de ácido nucleico que en sí misma codifique cualquiera de los polipéptidos de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos. Se prefiere que la célula de mamífero no humano sea una célula precursora embrionaria o un oocito. Cuando la célula de mamífero no humano es una célula ES, se prefiere que dicho uno o más genes exógenos se introduzcan mediante transfección. Cuando la célula de mamífero no humano es un oocito (célula huevo), se prefiere que dicho uno o más genes exógenos se introduzcan mediante microinyección de ADN. Preferiblemente, dicho uno o más genes exógenos se insertan en el genoma de la célula o el mamífero no humano, más preferiblemente dicho uno o más genes exógenos se insertan en una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena.

Se proporciona un método alternativo para producir un mamífero no humano genéticamente modificado capaz de expresar uno o más genes exógenos, que comprende realizar un método de la invención para obtener un mamífero no humano de la invención que no comprende una secuencia de ácido nucleico que en sí misma codifique cualquiera de los polipéptidos de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos, y en el que están presentes las secuencias de ácidos nucleicos de una o más regiones variables de IgH endógenas, de uno o más segmentos D de IgH endógenos y de uno o más segmentos J de IgH endógenos, y cruzar dicho mamífero no humano obtenido de esta manera con un mamífero transgénico compatible que tenga uno o más genes exógenos asociados o flanqueados por una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena y que tiene una recombinasa activa en la secuencia de recombinación específica de sitio no endógena para obtener una progenie, y opcionalmente seleccionar la progenie para la inserción de uno o más genes exógenos.

Se proporciona otro método alternativo para producir un mamífero no humano genéticamente modificado capaz de expresar uno o más genes exógenos, que comprende realizar un método de la invención para obtener un mamífero no humano de la invención que no comprende una secuencia de ácido nucleico que en sí misma codifique cualquiera de los polipéptidos de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina endógenos, y en el que todas las secuencias de ácidos nucleicos de la región variable y del segmento D y J de IgH endógenas están presentes, y cruzar dicho mamífero no humano obtenido de esta manera con un mamífero transgénico compatible que tiene uno o más genes exógenos asociados o flanqueados por una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena y que tiene una recombinasa activa en la secuencia de recombinación específica de sitio no endógena para obtener una progenie, y opcionalmente seleccionar la progenie para la inserción de uno o más genes exógenos.

En los anteriores métodos para producir un mamífero no humano genéticamente modificado, o una célula de mamífero no humano genéticamente modificada, capaz de expresar uno o más genes exógenos, se prefiere que la secuencia de recombinación específica de sitio no endógena sea una secuencia *loxP*, y la inserción sea mediante integración *Cre-loxP*. El mamífero no humano genéticamente modificado es preferiblemente un roedor, más preferiblemente un ratón.

Para proporcionar la producción de proteínas de unión xenogéneas (exógenas) (por ejemplo, proteínas de anticuerpo extrañas) en un hospedante, es necesario que el hospedante sea competente para proporcionar las enzimas necesarias y otros factores implicados en la producción de anticuerpos (por ejemplo, la maquinaria de recombinación celular), mientras que debe carecer de los genes endógenos para la expresión de las subunidades de IgC pesadas de inmunoglobulinas y, por tanto, no puede expresar los segmentos V, D y J remanentes después de la redistribución del ADN. Por tanto, estas enzimas y otros factores asociados con la redistribución de la línea germinal, el corte y empalme, la mutación somática y similares son preferiblemente funcionales en el hospedante. Sin embargo, una región natural funcional que comprende los diversos exones asociados con la producción de regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulinas endógenas estará ausente/delecionada en ciertas realizaciones de la invención.

En una estrategia de delección y reemplazo, el material genético exógeno para la inserción puede producirse a partir de una fuente de mamífero, preferiblemente una fuente humana, o puede producirse de modo sintético. El material puede codificar al menos parte de una inmunoglobulina conocida, o puede modificarse para que codifique al menos parte de una inmunoglobulina alterada. Las técnicas adecuadas para estos procesos son muy conocidas.

- 5 En el caso de la estrategia de delección y reemplazo, cuando la inserción de ADN xenogéneo es grande, pueden insertarse loci de Ig completos (1-3 Mb). El uso de la estrategia de reemplazo de Cre-*loxP* entonces permitiría la eliminación del locus y la inserción de un locus distinto.

El gen o genes exógenos son preferiblemente un gen de IgH o genes de IgH, más preferiblemente un gen C de IgH o genes C de IgH. El gen o genes exógenos pueden ser un gen humano o genes humanos, preferiblemente el gen o genes exógenos son genes de la región constante de cadena pesada de Ig humanos, más preferiblemente un locus de la región constante de cadena pesada de Ig humano, o un locus de cadena pesada de Ig humano, que tenga las regiones V, D, J y/o C.

15 En el ser humano, el locus de cadena pesada de las inmunoglobulinas está localizado en el cromosoma 14. En la dirección 5'-3' de la transcripción, el locus comprende una gran agrupación de genes de la región variable (V_H), los genes de la región de diversidad (D), seguido de los genes de la región de unión (J_H) y la agrupación de genes constantes (C_H). Se calcula que el tamaño del locus es de aproximadamente 2.500 kilobases (kb). Durante el desarrollo de las células B, segmentos génicos discontinuos del locus de IgH de la línea germinal se juxtaponen mediante una redistribución física del ADN. Para que pueda producirse un polipéptido de Ig de cadena pesada funcional, deben unirse tres segmentos de ADN discontinuos, de las regiones V_H , D y J_H , de una manera secuencial específica, V_H a DJ_H , generando la unidad funcional V_HDJ_H . Cuando V_HDJ_H se ha formado se producen cadenas pesadas específicas tras la transcripción del locus de Ig, utilizando como molde la unidad $V_HDJ_HC_H$ específica que comprende exones e intrones. Existen dos loci para las cadenas ligeras de Ig, el locus κ sobre el cromosoma 2 humano, y el locus λ sobre el cromosoma 22 humano. La estructura de los loci IgL es similar a la del locus IgH, excepto que la región D no está presente. Tras la redistribución de IgH, se logra la redistribución de un locus de cadena ligera de una manera similar mediante la unión de V_L y J_L a la cadena κ o λ . Los tamaños de los loci λ y κ son cada uno de 1-3 Mb. La expresión de la IgH redistribuida y de una cadena ligera Ig κ o Ig λ en una célula B particular permite la generación de moléculas de anticuerpos.

Las regiones V, D, J y/o C del locus de la cadena pesada de Ig humanas pueden estar en la configuración de la línea germinal, o pueden disponerse productivamente. En la configuración de la línea germinal, los exones están separados por secuencias intermedias, y así la secuencia génica debe disponerse para la expresión del gen o genes. Cuando están dispuestas productivamente, las secuencias intermedias se han eliminado de la secuencia génica, y así no es necesaria la redistribución de la secuencia génica para la expresión del gen o genes.

Una célula o un mamífero no humano capaz de expresar uno o más genes exógenos, obtenidos mediante un método descrito en la presente, pueden utilizarse para la producción de inmunoglobulinas exógenas, preferiblemente de inmunoglobulinas humanas.

Una inmunoglobulina exógena es una inmunoglobulina que no es nativa al mamífero o célula hospedante en el cual se produce; en algunas realizaciones de la invención se prefiere que la inmunoglobulina exógena comprenda una región variable de mamífero que no sea nativa al mamífero o célula hospedante en el cual se produce, y más preferiblemente la región variable de mamífero es una región variable humana.

40 Se ha descubierto que un mamífero no humano transgénico puede producir una inmunoglobulina quimérica o extraña (derivada de material genético exógeno insertado) en respuesta a un inmunógeno posteriormente introducido en el mamífero no humano transgénico. Por consiguiente, mediante la introducción de material genético extraño, por ejemplo humano, que codifica sustancialmente todas las regiones específicas de especie de una inmunoglobulina, es posible estimular al mamífero no humano transgénico para que produzca una inmunoglobulina extraña contra cualquier antígeno introducido en el animal. El animal transgénico por tanto puede proporcionar una fuente muy útil, conveniente y valiosa de inmunoglobulinas humanas contra una amplia gama de antígenos. Además, no existirían interferencias debidas a la expresión simultánea del polipéptido C de IgH endógeno.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para la producción de una inmunoglobulina exógena, que comprende un método para producir una célula o un mamífero no humano genéticamente modificado de la invención, que es capaz de expresar uno o más genes exógenos, siendo la inmunoglobulina una inmunoglobulina exógena con respecto al mamífero o la célula hospedante en el cual se produce. En un aspecto preferido, la inmunoglobulina exógena comprende una región variable de mamífero que no es nativa al mamífero o la célula hospedante en el cual se produce, más preferiblemente la región variable de mamífero es una región variable humana. En otro aspecto preferido, la inmunoglobulina exógena es una inmunoglobulina humana.

55 Cuando se emplea un mamífero no humano en un uso o un método para la producción de una inmunoglobulina exógena, el mamífero no humano es preferiblemente un roedor, más preferiblemente un ratón. Cuando se emplea una célula de mamífero no humano en un uso o un método para la producción de una inmunoglobulina exógena, la célula de mamífero no humano es preferiblemente una célula de roedor, más preferiblemente una célula de ratón.

También se proporciona un método para la producción de un medicamento que comprende un método de la invención para la producción de una inmunoglobulina exógena.

Descripción de las figuras

- 5 La figura 1 ilustra la estrategia para la eliminación del gen de la región constante de inmunoglobulinas de cadena pesada. Se insertó una secuencia loxP cadena arriba de un gen de un marcador seleccionable (puromicina) en el gen C más 5', y otro gen de un marcador seleccionable (neomicina) cadena arriba de una secuencia loxP se insertó cadena abajo del gen C final y más 3' en el potenciador 3'. Tras la expresión de Cre, esta estrategia dio como resultado la eliminación de una región de aproximadamente 200 kb con todos los genes C.
- 10 La figura 2 ilustra la construcción de transporte dirigido para la región 3', proporcionándose a la izquierda los digeridos de restricción que confirman el ensamblaje correcto.
- La figura 3 ilustra un ensayo de la transferencia Southern que muestra los fragmentos de la línea germinal (GL) cuando se hibridan con la sonda 3'ext (externa) indicada. Las muestras con inactivación (KO, "knock-out") o integración homóloga producen otra banda Sad de aproximadamente 10 kb y BamHI de 4 kb, además de una banda de la línea germinal más débil para el alelo modificado.
- 15 Las figuras 4 y 5 indican que, tras la transfección de ZX3 (ZX3 es una denominación interna de las células precursoras embrionarias murinas producidas utilizando los métodos descritos por Hogan, B., R. Beddington, F. Costantini, y E. Lacy, 1994, en *Manipulating the mouse embryo*, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press), se seleccionaron células precursoras embrionarias y se evaluaron, y a partir de 601 clones de células ES se identificó un acontecimiento de transporte dirigido, el clon nº 355. A la izquierda de la figura 5 se muestran posteriores análisis de la transferencia Southern del clon 355.
- 20 La figura 6 ilustra la construcción de transporte dirigido de C μ y el análisis de la secuencia de loxP en las dos construcciones de transporte dirigido, que verifican su orientación correcta para permitir la eliminación por delección mediada por Cre de todos los genes C.
- La figura 7 ilustra el esquema para la integración dirigida y la delección de la agrupación de los genes C.
- 25 La figura 8 muestra el análisis de la transferencia Southern de 355 homocigotos potenciales (3'E) derivados del clon de ES 355 y su cruzamiento hasta la homocigosidad. La banda de aproximadamente 4 kb indica el acontecimiento de transporte dirigido, la banda de aproximadamente 6,5 kb es la banda de la línea germinal, y ++ indica la integración dirigida en ambos alelos.
- 30 La figura 9 muestra el clon de células ES 355 que se utilizó para el transporte dirigido posterior con el vector de transporte dirigido de C μ . Las sondas externa se indican como A y B. Esto produce un acontecimiento de transporte dirigido dual, el clon 212.
- La figura 10 muestra cómo se verificó la integración. El clon 212 porta dos integraciones dirigidas, cadena arriba y cadena abajo de la agrupación de genes C. La transfección de las células ES con un vector Cre permite el análisis de la delección y sugiere que ambos acontecimientos de transporte dirigido se produjeron sobre un alelo.
- 35 La figura 11 demuestra que los clones, después de la transfección de Cre, parecen producir una banda de PCR utilizando los cebadores 1 y 4 ilustrados en la figura 7. Sin embargo, permanece una banda que indica la integración dirigida, los cebadores 1 y 2. Esto puede indicar clones mixtos o que no se logra la eliminación mediada por Cre-loxP en todas las células de los clones.
- 40 La figura 12 muestra el análisis de PCR de ratones de transmisión de la línea germinal potenciales (seleccionados por el color del pelo) para ambas integraciones dirigidas 3'E y μ . De forma inesperada, aproximadamente la mitad del número de ratones de transmisión de la línea germinal tenían un alelo que porta el acontecimiento de transporte dirigido 5' o 3', pero no ambos acontecimientos. De los 19 ratones, 6 fueron negativos, 7 positivos para la integración dirigida en 3'E, 5 positivos para la integración dirigida en μ , y uno fue positivo para ambos acontecimientos de transporte dirigido. Puesto que la transmisión de la línea germinal fue de aproximadamente 50% (la mitad de los ratones con el color de pelo correcto no tenían la modificación diana), parece que las dos integraciones dirigidas están sobre un alelo, pero el estre cruzamiento con frecuencia separa las dos regiones.
- 45 La figura 13 muestra los resultados del análisis de PCR de un gran número de ratones de transmisión de la línea germinal (seleccionados basándose en el color del pelo) que resulta en la identificación de 7 ratones que portan ambos acontecimientos de transporte dirigido 3'E y μ . De 51 ratones, 22 fueron negativos, 14 positivos para la integración dirigida en 3'E, 7 positivos para la integración dirigida en μ , y 7 fueron positivos para ambos acontecimientos de transporte positivo 3'E y μ .
- 50 La figura 14 muestra el esquema para el análisis de PCR de ratones IgHC-inactivados (delección).
- La figura 15 muestra los análisis de PCR de las crías de la primera y segunda generación obtenidas tras cruzar los

dos ratones de transmisión de la línea germinal que portan ambos acontecimientos de transmisión dirigida, μ^{lox} y $3'E^{lox}$, con animales Cre^+ .

La figura 16 muestra los resultados del análisis de citometría de flujo de células de médula ósea y de bazo procedente de ratones homocigóticos $C\Delta$ (deleción de IgHC).

- 5 La figura 17 muestra (A) los resultados del análisis de la redistribución de D-J y V-D-J mediante PCR, que se realizó para ensayar la implicación del locus IgH en la redistribución del ADN procedente de células de la médula ósea, y (B) análisis transcripcionales de RT-PCR de una sola etapa de ARN preparado a partir de células de médula ósea y RT-PCR de una sola etapa.

- 10 La figura 18 muestra los resultados de un ELISA realizado en suero de ratones F1, $C\Delta$ y μ MT; en el suero de ratones $C\Delta$ no se detectó la presencia de ninguna Ig ni de fracciones individuales de IgM, IgG o IgA.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de la construcción de transporte dirigido para la región $C_m 5'$

- 15 Un banco de fago λ , obtenido de ADN de células ES (precursoras embrionarias) E14 (Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) se hibridó con un fragmento BamHI de 4,5 kb que comprende C_μ (Zou *et al.*, Int. Immunol., 13, 1489-1499, 2001). Se identificaron y cartografiaron varios clones positivos. Los métodos de hibridación están bien documentados en la bibliografía y son conocidos por los expertos en la técnica.

- 20 Se añadió un sitio *loxP* al gen de puromicina (Tucker *et al.*, Genes Dev., 10, 1008-1020, 1996) mediante PCR (cebador oligonucleotídico directo BamHI-*loxP*-puro: 5' TTTGGATCCATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATCGACCTCGAAATTCTACCGGG 3' (SEQ ID NO:1) y el cebador oligonucleotídico inverso BclII-puro: 5' TTTGATCAGCTGATCTCGTTCTTCAGGC 3' (SEQ ID NO:2) que permiten la recuperación de *loxP*-puro sobre un fragmento BamHI-BclII).

- 25 Se unió el fragmento de aproximadamente 6,5 kb de JH3/4 a $C_\mu 1$ y se unió el fragmento de aproximadamente 5,5 kb de $C_\mu 2$ a C_δ con un gen de resistencia a puromicina-*loxP* sobre un fragmento BamHI-BclII de aproximadamente 2 kb (véase la figura 6).

- Se ensambló la construcción de transporte dirigido para $C_\mu (\mu^{lox})$ mediante la subclonación de fragmentos BamHI-BglIII en pUC19 (Invitrogen). El sitio EcoRI 3' se sustituyó por NotI utilizando una digestión parcial y una inserción de conector de extremo romo. En la construcción de transporte dirigido 5' resultante para C_μ , se insertó una secuencia *loxP* cadena arriba de un gen de un marcador seleccionable (puromicina) que estaba insertado en el gen C_μ .

30 Ejemplo 2: Preparación de la construcción de transporte dirigido para la región $\alpha 3'$

El banco de fago λ (véase anteriormente), obtenido de ADN de células ES (precursoras embrionarias) E14, se hibridó con un fragmento BglIII de 3,5 kb que comprende el potenciador $\alpha 3'$ de rata (Pettersson *et al.*, Nature, 344, 165-168, 1990) y se identificaron y cartografiaron varios clones positivos.

- 35 La región potenciadora $\alpha 3'$ sobre un fragmento SacI de aproximadamente 9 kb se clonó en pUC19 y el sitio EcoRV interno se cambió a Spcl mediante una digestión parcial y una inserción de conector de extremo romo. Este sitio exclusivo permite la integración de un gen de neomicina-*loxP* de aproximadamente 1,3 kb sobre un fragmento NheI compatible (véase la figura 2). Se añadió un sitio *loxP* al gen de resistencia a la neomicina (Stratagene, La Jolla, CA) mediante inserción de extremo romo de *loxP* procedente de pGEM-30 (Gu, H., Y.-R. Zou, y K. Rajewsky, Cell, 73, 1155-1164, 1993) y mediante inserción de oligonucleótidos (Sauer, Mol. Cell. Biol., 7, 2087-2096, 1987) en la construcción de transporte dirigido $\alpha 3'$ ($3'E^{lox}$) cadena abajo del gen de neomicina.

Ejemplo 3: Confirmación de la orientación de los sitios *loxP*

- 45 La orientación correcta del sitio *loxP* en cada construcción de transporte dirigido se verificó mediante secuenciación de ADN (véase la figura 6). Los sitios *loxP* deben estar en la misma orientación lineal entre sí de forma que pueda obtenerse, tras la inserción dirigida de ambos sitios *loxP*, la eliminación por deleción mediada por Cre. En este caso, esto permite la eliminación de ambos genes de marcadores seleccionables insertados y la región entre C_μ y el potenciador $3'\alpha$ al final de la agrupación de genes C.

Ejemplo 4: Preparación de células ES

- 50 Se produjeron células ES ZX3, obtenidas a partir de la raza de ratón 129 sv, utilizando los métodos descritos en Hogan, B., R. Beddington, F. Costantini, y E. Lacy, 1994, en Manipulating the mouse embryo, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. ZX3 es una denominación interna de estas células precursoras embrionarias murinas obtenidas por Zou-Xiangang tras el 3^{er} intento.

Ejemplo 5: Transfección de células ES e hibridación Southern

La construcción de transporte dirigido de $C\mu$ se linealizó utilizando BamHI y NotI, y la construcción de transporte dirigido del potenciador $\alpha 3'$ se linealizó con BglII y EcoRV (véase la figura 3). Para cada construcción por separado, aproximadamente 10 μg del fragmento purificado (kit de purificación nº 28304, Qiagen, Crawley, West Sussex, Reino Unido) se mezclaron con aproximadamente 10^7 células ES ZX3, obtenidas a partir de la raza de ratón 129 sv, y se sometieron a una electroporación y a una selección según se ha descrito (Zou *et al.*, Eur. J. Immunol., 25, 2154-2162, 1995; Zou *et al.*, Int. Immunol., 13, 1489-1499, 2001). Se preparó ADN procedente de clones resistentes a G418 (Neo^r) para la construcción de potenciador $\alpha 3'$ y se analizó en análisis de la transferencia Southern según se ha descrito (Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Esto permitió la identificación de un clon en el que el transporte dirigido fue correcto (355) que se utilizó para la introducción de la construcción de $C\mu$ y la selección con puromicina, que produjo un clon en el que el transporte dirigido fue correcto (212) identificado con la inserción correcta en $C\mu$ y el potenciador $3'\alpha$.

Las sondas de hibridación fueron un fragmento EcoRV-SacI externo $3'$ de aproximadamente 0,4 kb para el potenciador $\alpha 3'$ (véase la figura 5), y sondas externas $5'$ y $3'$ para $C\mu$ descritas en Zou *et al.*, Int. Immunol., 13, 1489-1499, 2001 (véanse las figuras 9 y 10). Estas fueron una sonda externa $5'$, un fragmento BamHI-BglII de aproximadamente 0,5 kb, y una sonda externa $3'$ de 335 pb, obtenidas mediante PCR utilizando ADN plasmídico con los siguientes oligonucleótidos: cebador directo $5'$ AACCTGACATGTTCTCC $3'$ (SEQ ID NO:3) y cebador inverso ($5'$ GGGATTAGCTGAGTGTGG $3'$) (SEQ ID NO:4). Las condiciones de PCR fueron de 95°C durante 1 min, 58°C durante 1 min, y 72°C durante 30 seg con 30 ciclos.

Se realizaron análisis de la transferencia Southern como se indicó anteriormente, ofreciéndose los resultados en las figuras 3, 4 y 5 que muestran los fragmentos de la línea germinal (GL) cuando se hibridan con la sonda $3'\text{ext}$ (externa) indicada. Las muestras con integración homóloga o inactivadas (KO) producen otras bandas SacI de aproximadamente 10 kb y BamHI de aproximadamente 4 kb (3,8 kb), además de una banda de la línea germinal más débil para el alelo no modificado.

La figura 9 muestra los resultados del clon de células ES 355 que se utilizó para la posterior integración del vector de transporte dirigido de $C\mu$. Se realizó un análisis de la transferencia Southern utilizando la sonda B y la sonda A (no se muestra) que identificó un acontecimiento de transporte dirigido doble, el clon 212.

Para la delección mediada por Cre en la transfección transitoria, se mezclaron 10 μg del plásmido superenrollado pBS185 (Gibco, nº de catálogo 10347-011) con 10^7 células ES en 0,8 ml de medio de células ES y se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 min. Después de la transferencia a una cubeta de separación de electrodos de 0,4 cm (Bio-Rad, 65-2088) se aplicaron pulsos eléctricos dos veces a 230 V y 500 μF . Las células se cultivaron a 37°C durante 30 min y después se trasladaron en baja densidad a placas de 6 pocillos que contenían células alimentadoras. Después de 8 a 10 días en cultivo se recogieron los clones y se dividieron en partes iguales para ensayar su supervivencia en un medio de selección. Aproximadamente 10% de los clones murieron y en sus fracciones separadas se identificó la delección mediante PCR y análisis de la transferencia Southern.

La figura 10 muestra cómo se verificó la integración mediante análisis de la transferencia Southern tal como se describió anteriormente. El clon 212 porta dos integraciones dirigidas, cadena arriba y cadena abajo de la agrupación de genes C. La transfección de las células ES con el vector Cre permite la delección, que aumentó la banda de hibridación resultante tal como se esperaba.

La eliminación de los 8 genes de la región C en una región de aproximadamente 200 kb implicó la integración dirigida de construcciones de homología flanqueadas por $loxP$ (μ^{lox} y $3'E^{lox}$) en los exones 1 y 2 de $C\mu$, con la eliminación de un fragmento BglII-BamHI de 330 pb, y en el potenciador $3'$, localizado aproximadamente 15 kb cadena abajo de $C\alpha$ (figura 7). La integración homóloga se identificó mediante una hibridación Southern utilizando sondas externas (figura 10). Esto produjo, en una digestión BglII y una hibridación con la sonda $5'J_H$, una banda de la línea germinal de 8,3 kb y de transporte dirigido de 7,8 kb, mientras que la sonda $3'E$ identificó una banda de la línea germinal de 11,2 kb y de transporte dirigido de 12,5 kb. Utilizando la sonda $3'E$ en una digestión BamHI se identificó una banda de la línea germinal de 6,5 kb y de transporte dirigido de 4 kb. Para evaluar la eficacia de la eliminación del gen C mediada por Cre- $loxP$, se transfectó el plásmido de Cre pBS185 y se expresó de forma transitoria en células ES con transporte dirigido doble. Tras la delección del gen C se obtuvo un fragmento BglII de 15 kb cuando se hibrida con la sonda $5'J_H$ y, por separado, con la sonda $3'E$, y en una digestión BamHI se obtuvo un fragmento de 11,5 kb con la sonda $3'E$. Estos descubrimientos están de acuerdo con el mapa del locus. El análisis de las colonias individuales mediante transferencia Southern y PCR, ofreciéndose ejemplos en la figura 10, demuestra la delección del locus en aproximadamente 10% de los clones. Esto está de acuerdo con la evaluación inicial de la captación celular y la expresión del gen Cre que se verificó transfiriendo parte de cada colonia a un medio selectivo en el que aproximadamente 1 de cada 10 clones murió. El clon de células ES con transporte dirigido doble 212 se empleó para obtener ratones, puesto que una delección *in vitro* puede obtenerse con facilidad, lo cual sugiere que ambas modificaciones se integraron en el mismo alelo y que la delección *in vitro* probablemente puede lograrse cruzando los ratones de transmisión de la línea germinal con los que expresan Cre [15].

La verificación de los dos acontecimientos de integración dirigida cadena arriba ($5' C\mu$) y cadena abajo ($\alpha 3'$) de la agrupación de genes C se confirmó en el clon 212 mediante una transfección transitoria de las células ES con el vector Cre y un análisis de la delección mediante PCR utilizando la pareja de cebadores 1-4 (véanse las figuras 7 y 14, para P1 y P4 véanse los ejemplos) que demuestra la delección de la agrupación de genes C y sugiere que la integración dirigida de las dos construcciones se produjo sobre un alelo (véase la figura 11).

La figura 11 demuestra que los clones después de la transfección de Cre parecen producir una banda de PCR utilizando los cebadores 1 y 4 ilustrados en las figuras 7 y 14, y en el ejemplo 8. Sin embargo, permaneció una banda que indica la integración dirigida, los cebadores 1 y 2. Esto puede indicar clones mixtos o que no se logra la eliminación mediada por Cre-*loxP* en todos las células del clon. Nótese que, puesto que esto no se observa en las hibridaciones de transferencia Southern, figura 10, es probable que represente un nivel bajo de contaminación detectado por una amplificación con PCR muy eficaz.

Ejemplo 6: Generación de ratones y cruzamientos

Se inyectaron clones de células ES con acontecimientos de transporte dirigido (355 para el único acontecimiento de transporte dirigido del potenciador $\alpha 3'$, integración de $3'E^{lox}$ en el potenciador $\alpha 3'$, y 212 para los acontecimientos de transporte dirigido del potenciador $\alpha 3'$ ($3'E^{lox}$) y de $5' C\mu$ (μ^{lox}) en blastocistos de BALB/c, se transplantaron en madres de acogida (C57BL/6 x CBA)F1 y se obtuvieron ratones quiméricos y de transmisión de la línea germinal según se ha descrito (Hogan, B., R. Beddington, F. Costantini, y E. Lacy, 1994, *Manipulating the mouse embryo, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Los ratones después se analizaron mediante PCR como se describe a continuación y se obtuvieron, cruzaron e investigaron según las normas de licencias de proyectos de UK Home Office.

El cruzamiento de animales que portan ambos acontecimientos de transporte dirigido con ratones Cre (para los métodos, véase la referencia 15, Zou *et al.* (2003)) produjo la delección del locus.

Ejemplo 7: Análisis de la transferencia Southern de ratones de transmisión de la línea germinal producidos a partir del clon de ES 355

Se realizó un análisis de la transferencia Southern de ratones de transmisión de la línea germinal producidos a partir del clon de ES 355, con los ratones producidos a partir de estos cruzados hasta la homocigosidad, utilizando la sonda E externa $3'$ (C en la figura 7). La banda de aproximadamente 4 kb indica el acontecimiento de transporte dirigido, la banda de aproximadamente 6,5 kb es la banda de la línea germinal, y ++ indica la integración dirigida en ambos alelos. Los resultados de la transferencia Southern se proporcionan en la figura 8.

Para la obtención de ratones transgénicos que expresan la proteína Cre de forma ubicua se linealizó el plásmido de Cre pBS185 (GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, Reino Unido) con Scal y se purificó utilizando un kit de purificación de ADN (nº 28304, Qiagen, Crawley, West Sussex, Reino Unido). El ADN se microinyectó en el pronúcleo masculino de embriones F1 (CBA x B57Bl/6) según métodos convencionales (Hogan, véase anteriormente) y se produjeron varios fundadores, dos de los cuales mostraron una alta tasa de delección de genes/loci cuando se cruzan con ratones *loxP*.

La figura 12 muestra que, de forma inesperada, aproximadamente la mitad de los ratones de transmisión de la línea germinal obtenidos a partir del clon 212 tenían un alelo que porta el acontecimiento de transporte dirigido $5'$ o $3'$, pero no ambos acontecimientos. Puesto que la transmisión de la línea germinal fue de aproximadamente 50% (la mitad de los ratones con el color de pelo correcto no tenían la modificación específica de sitio), parece que las dos integraciones dirigidas están sobre un alelo, pero el estre cruzamiento con frecuencia separa las dos regiones.

El análisis de un gran número de ratones mediante PCR identificó 7 ratones que portaban ambos acontecimientos de transporte dirigido (figura 13). El cruzamiento de estos ratones con ratones que expresan Cre mostró la delección del locus, dando como resultado la producción de un ratón con la delección del agrupamiento de genes C de IgH en un alelo.

Ejemplo 8: Selección de PCR de ratones con inactivación de C de IgH (delección)**Cebadores**

NOMBRE (J. Coadwell)	NOMBRE (L. Ren)	LONGITUD	SECUENCIA (5' a 3')
P1 V00818f.pri	MIgHKO1F	27 pb	AGAGCCCCCTGTCTGATAAGAATCTGG
P1 corresponde a SEQ ID NO:5, este es un cebador directo que se une a la región μ .			
P2 puromycinr.pri	MIgHKO2R	23 pb	TGGATGTGGAATGTGTGCGAGGC
P2 corresponde a SEQ ID NO:6, este es un cebador inverso que se une a la región μ .			
P3 neomycinr.pri	MIgHKO3F	23 pb	TGCTTTACGGTATCGCCGCTCCC
P3 corresponde a SEQ ID NO:7, este es un cebador directo que se une a la región potenciadora 3'.			
P4 X96607r.pri	MIgHKO4R	22 pb	GAGTCCCCATCCCCAAGGCTGG
P4 corresponde a SEQ ID NO:8, este es un cebador inverso que se une a la región potenciadora 3'.			

Métodos de PCR

- 5 Para cada una de las PCR utilizadas para la selección de ratones de inactivación de IgH, las reacciones se establecieron del siguiente modo:

Por cada 20 μ l de reacción:	
10 x tampón	2,0 μ l
dNTP 2 mM	2,0 μ l
cebador directo 20 mM	0,8 μ l
cebador inverso 20 mM	0,8 μ l
Taq preparada en el laboratorio	0,1 μ l
cola de ADN diluida	1,0 μ l
agua	13,3 μ l

Las parejas de cebadores directo e inverso utilizadas para cada tipo de PCR fueron:

- 10 i. PCR 212: MIgHKO1F (SEQ ID NO:5) y MIgHKO2R (SEQ ID NO:6)
 ii. PCR 355: MIgHKO3F (SEQ ID NO:7) y MIgHKO4R (SEQ ID NO:8)
 iii. PCR de delección: MIgHKO1F (SEQ ID NO:5) y MIgHKO4R (SEQ ID NO:8)

El 10 x tampón utilizado fue KCl 500 mM, Tween 20 al 0,05%, Tris-Cl 100 mM, pH 9,0, MgCl₂ 1,5 mM.

- 15 Las reacciones se realizarán como sigue: 5 minutos a 95 °C durante 1 ciclo, 30 segundos a 94 °C, después 45 segundos a la temperatura de hibridación apropiada, seguido de 1 minuto a 72 °C para 30 ciclos, después 10 minutos a 72 °C para 1 ciclo. Tras lo cual las reacciones se mantuvieron a 6 °C hasta que se analizaron.

Las temperaturas de hibridación utilizadas para cada tipo de reacción fueron:

- i. PCR 212: 62 °C
 ii. PCR 355: 62 °C
 iii. PCR de delección: 66 °C

Ejemplo 9: El mosaicismo alélico se transmite a través de la línea germinal

Los resultados de cruzamiento para los dos primeros ratones de transmisión de la línea germinal que portan ambos acontecimientos de unión, μ^{lox} y $3'E^{lox}$, con animales Cre^+ (1ª generación), y el posterior cruzamiento de ratones de delección de C ($C\Delta$) para obtener animales homocigóticos sin genes C de IgH remanentes (2ª generación) se ilustra en la tabla 1.

Tabla 1: Tasa de transmisión de la integración homóloga y la delección del locus

Genotipo: 1ª generación ^a			Genotipo: 2ª generación ^b		
integración homóloga	delección	nº (%)	integración homóloga	delección	nº (%)
-	+	0 (0)	-	+	4 (11)
+	+	2 (5)*	+	+	0 (0)
+	-	24 (60)	+	-	10 (26)
tipo salvaje		14 (35)	tipo salvaje		24 (63)

(a) Los ratones de transmisión de la línea germinal que portan ambos acontecimientos de unión (μ^{lox} y $3'E^{lox}$) se cruzaron con ratones Cre heterocigóticos. De los 71 ratones de la primera generación analizados mediante PCR, 40 fueron Cre^+ y para estos animales se muestra la presencia de la integración dirigida y la delección del locus.

(b) Los ratones de delección de la 1ª generación (*) se cruzaron después con ratones F1 normales, lo cual produjo 38 animales analizados mediante PCR con una delección de locus o, por separado, los acontecimientos de transporte dirigido o sin ninguna modificación.

En los ratones de 1ª generación producidos, la transmisión de Cre fue algo mejor que el 50% esperado, portando un gran número de ratones los acontecimientos de transporte dirigido. Esto implica que ambas integraciones dirigidas se produjeron en un alelo, aunque el tamaño y la complejidad del locus de IgH impidió la determinación de la unión cromosómica por medios moleculares. Sin embargo, en estos animales de la 1ª generación, $C\Delta$ sólo pudo lograrse en dos ratones, que también mantuvieron las bandas de PCR para los acontecimientos de transporte dirigido (figura 15). Este nivel bajo de delección mediada por $Cre-loxP$, acompañado de un mosaicismo del locus, no fue evidente en los cruzamientos previos utilizando los ratones Cre pBS185 [15]. Esto puede ser debido a una menor eficacia de delección en ratones heterocigóticos debido a unos niveles reducidos de Cre o, como alternativa, a la inaccesibilidad del locus de IgH. Las combinaciones de cruzamiento de animales macho o hembra Cre^+ con ratones μ^{lox} y $3'E^{lox}$ no cambiaron este resultado. No obstante, los descubrimientos sugieren que la delección del locus puede lograrse pero no con una alta eficacia en todas las células. Trabajando sobre la suposición de que la delección mediada por $Cre-loxP$ puede producirse operativamente temprano en el desarrollo fetal, esta resultó ser correcta, puesto que el posterior cruzamiento de ratones que portan la delección dirigida y los dos acontecimientos de integración homóloga produjo unas crías con la delección transmitida y sin integración dirigida remanente (figura 15, carril 4 y 5). La frecuencia con que se obtuvieron ratones $C\Delta$ heterocigóticos a partir del cruzamiento de los fundadores mosaico fue considerablemente menor que la transmisión de las integraciones dirigidas e incluso el número de ratones de tipo salvaje, lo cual sugiere los siguientes acontecimientos. Un huevo fertilizado porta un alelo de tipo salvaje de IgH, un alelo de IgH con transporte dirigido doble, y Cre integrado aleatoriamente en el genoma. La delección mediada por Cre funciona de manera desproporcionada, y en la etapa de 4 células sólo uno de los blastómeros porta el alelo delecionado y un alelo de tipo salvaje, mientras que los otros tres blastómeros portan cada uno un alelo de transporte dirigido doble y un alelo de tipo salvaje. Este patrón de distribución se mantiene durante el desarrollo, y tras la meiosis, 4 de 8 células germinales (50%) tienen el alelo de tipo salvaje, 3 de 8 (37,5%) el alelo de transporte dirigido, y 1 de 8 (12,5%) la delección. Aunque los números en la tabla 1 son demasiado pequeños para corresponder exactamente a este cálculo, demuestran que la mayoría de los ratones de la 2ª generación son de tipo salvaje, que el número intermedio de ratones portan las integraciones dirigidas y que, a 11%, se encuentra una correspondencia cercana para el número de ratones $C\Delta$, lo cual apoya en gran medida la predicción de que la recombinación mediada por Cre puede ser desproporcionada en etapas tempranas del desarrollo.

Ejemplo 10: Análisis de PCR de la delección y la redistribución

La integración homóloga en $C\mu$ y el potenciador $\alpha 3'$ se identificó utilizando 2 conjuntos de oligonucleótidos (véase la figura 1): (1) $C\mu$ directo (5' AGAGCCCCCTGTCTGATAAGAATCTGG 3', SEQ ID NO:5), y (2) puro (5' TGGATGTGGAATGTGTGCGAGGC 3', SEQ ID NO:6), produjeron un fragmento de aproximadamente 485 pb; mientras que (3) neo (5' TGCTTTACGGTATCGCCGCTCCC 3', SEQ ID NO:7), y (4) $3'E$ (5' GAGTCCCCATCCCCAAGGCTGG 3', SEQ ID NO:8) produjeron un fragmento de aproximadamente 500 pb. Tras la eliminación del gen C, los oligonucleótidos (1) y (4) produjeron una banda de delección de aproximadamente 613 pb. La presencia del transgén Cre y del gen $\gamma 2a$ en el locus de IgH endógeno se identificó utilizando los siguientes oligonucleótidos: Cre directo 5' GGACATGTTCAGGGATCGCCAGG 3', SEQ ID NO:9, y Cre inverso 5'

GATAGCTGGCTGGTGGCAGATGG 3', SEQ ID NO:10, y $\gamma 2a$ directo 5' GGCTGGGATGGGCATAAGGATAAAGGTC 3', SEQ ID NO:11, y una mezcla 1:1 de $\gamma 2a^a$ inverso 5' GTAGCTATTTCTTTCCACCCAGTTCTTC 3', SEQ ID NO:12, y $\gamma 2a^b$ inverso 5' GAAAAGACTTCTCTTTCCCAAGTGCTC 3', SEQ ID NO:13, que fueron específico de alotipo. Las condiciones de PCR óptimas fueron de 94 °C durante 45 sg, 60 °C (Cre, $\gamma 2a$) o 62 °C ($C\mu$ -puro, neo-3'E) o 66 °C ($C\mu$ -3'E) durante 1 min o 45 sg (Cre), y 72 °C durante 45 sg con 30 ciclos, seguido de 10 min a 72 °C para completar la reacción.

Para el análisis de la redistribución de D-J y V-D-J se preparó ADN y ARN a partir de células de la médula ósea utilizando el reactivo Tri (Sigma) y el sistema de RT-PCR One-Step (Invitrogen, Life Technologies). Se emplearon combinaciones de los siguientes oligonucleótidos: una mezcla 1:1 de DF (5' GCATGTCTCAAAGCACAATG 3', SEQ ID NO:14) y DQ52 (5' ACCCTGGACACAGGAAACAC 3', SEQ ID NO:15) cebadores directos; una mezcla 1:1 de VJ558L (5' ATGGGATGGAGCTGGATCTT 3', SEQ ID NO:16) y VJ558CL (5' ATGGAATGGAGCTGGGTCTT 3', SEQ ID NO:17) cebadores directos; cebador inverso JH1-4 (5' GAGACDGTGASHRDRGTBCCTKSRC 3', SEQ ID NO:18 con R = A + G, K = G + T, H = A + T + C, B = G + T + C, y D = G + A + T); y lamina B1, un gen expresado de forma ubicua como control, lamina para 5' GTATGAGGCGGCACTAAACTCTAA 3', SEQ ID NO:19, y una mezcla 1:1 de ADN genómico de lamina inverso 5' GAAGCCACTGAAGAACACAAATAG 3', SEQ ID NO:20, y ADNc de lamina inverso 5' TACGAAACTCCAAGTCCTCAGTAA 3', SEQ ID NO:21. Las condiciones de la PCR fueron de 35 ciclos de 92 °C durante 15 sg, 60 °C durante 30 sg, y 72 °C durante 40 sg, y las condiciones de la RT-PCR fueron 30 min a 50 °C, y 2 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 92 °C durante 15 sg, 50 °C durante 30 sg, y 72 °C durante 40 sg, seguido de 10 min a 72 °C para completar la reacción.

20 Ejemplo 11: Bloqueo en el desarrollo en la etapa preB-I

Para investigar la capacidad en el desarrollo de la población de linfocitos en ratones $C\Delta$ homocigóticos se analizaron células de la médula ósea y de bazo mediante citometría de flujo (figura 16).

Análisis de citometría de flujo

Se prepararon suspensiones de células de médula ósea y de bazo a partir de ratones normales F1 (C57/BL6 x CBA), ratones μ MT (ratones mutantes homocigóticos μ MT^{-/-} ($C\mu$) [11]) y ratones de delección de $C\Delta$. Se tiñeron células de médula ósea con cuatro combinaciones de colores (véase la figura 4) con el c-kit anti-ratón conjugado con PE (CD117, 09995B, BD PharMingen, San Diego, CA), CD45R anti-ratón conjugado con APC (B220, 01129A, BD PharMingen), CD25 anti-ratón conjugado con biotina (01092A, BD PharMingen), IgM anti-ratón de rata monoclonal conjugado con FITC (específico de la cadena μ , 04-6811, Zymed, San Francisco, CA), CD43 anti-ratón conjugado con biotina (01602D, BD PharMingen), IgD anti-ratón conjugado con FITC (02214D, BD PharMingen), y/o cadena L de Ig κ anti-ratón conjugado con PE (559940, BD PharMingen). Las células de bazo se tiñeron con CD45R anti-ratón conjugado con APC, IgM anti-ratón conjugado con biotina (específico de la cadena μ , 02082D, BD PharMingen), Ig κ anti-ratón conjugado con PE y CD21/CD35 anti-ratón conjugado con FITC (CR2/CR1, 553818, BD PharMingen). Las reacciones con anticuerpos conjugados con biotina posteriormente se incubaron con estreptavidina conjugada con Tri-color (SA10006, Caltag). Las células se analizaron en un FACSVantage y se utilizó CELLQuest para el análisis de los datos.

Para la tinción de la superficie celular, se emplearon anticuerpos marcados contra el marcador B220 de pancélulas B (CD45R) en combinación con anticuerpos que permiten la identificación de las diversas etapas de diferenciación sucesivas en el desarrollo de las células B. En la médula ósea (figura 16A), esto demostró que las poblaciones en la etapa progenitora y precursora, pro- y precélulas B *c-kit*⁺ B220⁺ y precélulas B CD43⁺ B220⁺, se mantienen, pero desaparecen los linfocitos B220⁺ más maduros. La ausencia de una gran población de células B B220⁺ es similarmente pronunciada en ratones $C\Delta$ y μ MT con exones de membrana alterados [16] y se establece en la etapa preB-II con la ausencia de células B CD25⁺ que normalmente expresan un preBCR con una cadena H μ y una cadena L sustituta. La eliminación de la agrupación de genes C conduce a la desaparición completa de células B inmaduras y maduras que expresan la cadena H y L de Ig, y la tinción de la cadena L de IgM, IgD, Ig κ de superficie y células B maduras CD21/35 positivas (figura 16B) revela su total ausencia.

Ejemplo 12: Inactividad transcripcional a pesar de la redistribución del ADN

La conservación de unos niveles normales de procélulas B en ratones $C\Delta$ sugiere que pueden mantenerse acontecimientos de diferenciación tempranos. Para ensayar la implicación del locus de IgH en la redistribución del ADN, se preparó ADN de células de la médula ósea y se analizó la redistribución de D-J y V-D-J mediante PCR. Para la región entre DQ52 y J_H, un fragmento de aproximadamente 1200 pb indica la configuración de la línea germinal, mientras que las bandas de amplificación de tamaño menor son el producto de una recombinación D-J_H y V_H-D-J_H exitosa. En ratones $C\Delta$ se identificó una extensa redistribución del ADN para la uniones D-J más tempranas en el desarrollo, así como para la recombinación de V-D-J (figura 17A). Se predicen unos fragmentos de PCR de aproximadamente 500 pb para la redistribución D-J y >300 pb para V-D-J, representando las bandas más grandes amplificaciones aún presentes de J_H distales remanentes después de la recombinación. Los ratones $C\Delta$ producen bandas del intervalo de tamaño esperado, que tenían un patrón e intensidad similares a los encontrados en ratones normales y ratones μ MT analizados en paralelo. Para los análisis transcripcionales se preparó ARN a partir de

células de la médula ósea, y una RT-PCR de una sola etapa que emplea ARN procedente de aproximadamente 10^6 células por reacción reveló que se produjeron pocas o ninguna transcripciones de cadena H redispuesta en ratones C Δ (figura 17B). El bajo nivel de transcripción remanente puede venir indicado por las bandas débiles en algunas de las reacciones o, como alternativa, esto puede representar el fondo debido a la baja rigurosidad de las reacciones o los oligonucleótidos utilizados para la amplificación. Sin embargo, la utilización de ARN de ratones normales, así como de ratones μ MT, produjo bandas de RT-PCR discernibles del intervalo de tamaño esperado que establecen una marcada diferencia después de la redistribución de ADN de cadena H entre ratones μ MT que muestran una transcripción de la cadena H totalmente funcional y ratones C Δ con una cadena H transcripcionalmente silenciosa. Los inventores repitieron los análisis de PCR y RT-PCR con aproximadamente 10^5 y aproximadamente 5×10^5 células de médula ósea CD43⁺ B220⁺, respectivamente, clasificadas mediante citometría de flujo. Se obtuvieron bandas diferenciadas pero patrones menos diversos en ratones normales y μ MT, pero de nuevo los ratones C Δ no produjeron productos de RT-PCR (los datos no se muestran). Una amplificación mediante PCR de lamina B1, un gen expresado de forma ubicua utilizado como control, produjo un fragmento genómico de aproximadamente 433 pb y un producto de ADNc de aproximadamente 215 pb, identificados en todos los ratones.

El descubrimiento de que los ratones C Δ son transcripcionalmente inactivos concuerda con su falta de anticuerpos séricos.

ELISA

Fueron capturados anticuerpos séricos mediante ELISA [33] sobre placas Falcon (353911, Becton Dickinson) revestidas con 50 μ l de anti-IgM 10 μ g/ml (específico de la cadena μ) (Sigma M-8644), anti-IgG (específico de la cadena γ) (Binding Site AU272), anti-IgA (específico de la cadena α) (Sigma M-8769) o cadena L κ anti-ratón (Sigma K-2132). El anticuerpo unido se identificó utilizando anti-Ig biotinilado (dilución 1/500, Amersham RPN 1001) o anti- κ (dilución 1/200, Zymed 04-6640), seguido de una dilución 1/200 de peroxidasa de rábano conjugada con estreptavidina (Amersham 1052). Se midió la A_{492} en un Titertek Multiskan MCC/340.

En el ELISA no se encontró la presencia de ninguna Ig ni de fracciones individuales de IgM, IgG o IgA en el suero de ratones C Δ (figura 18), mientras que la expresión de Ig en ratones μ MT parece ser similar a los niveles de expresión previamente indicados [12-14]. El defecto en la producción de Ig, reenfatizado por la falta de Ig κ , demuestra que ningún fragmento de cadena H de anticuerpo ni cadenas L por sí solas están siendo expresados en ratones C Δ .

La inserción dirigida de sitios *loxP*, 5' y 3' de la agrupación de genes C_H, permite la eliminación mediada por Cre de una región de aproximadamente 200 kb que produce una línea de ratón deficiente en Ig. Aunque se logró la delección *in vitro* con la eficacia esperada mediante la expresión transitoria de Cre, la eliminación de genes C *in vivo* mediante el cruzamiento con ratones que expresan Cre de forma ubicua resultó difícil. Como resultado, y a pesar de la transmisión normal del transgén Cre, pocos animales portan la delección del gen C (véase la tabla 1). Esta falta de eficacia no se observa cuando se eliminan aproximadamente 400 kb del locus de la cadena L de Ig λ mediante un cruzamiento con la línea de ratón Cre [15,17 y ENSEMBL Mouse Release 17.30.1 (ensamblaje NCBI 30)] y no está claro por qué se producen diferentes niveles de eficacia en los dos loci de Ig diana. En la primera generación de ratones que portan la delección del gen C (camadas de ratones Cre⁺ cruzados con ratones μ^{lox} 3'E^{lox}), analizados mediante PCR de la cola de ADN, a la banda de delección siempre le acompaña la presencia de bandas para los acontecimientos de transporte dirigido. Un problema con la eficacia de la recombinación mediada por Cre se ha relacionado con su promotor y se ha demostrado que el promotor inmediato temprano principal del citomegalovirus (CMV) humano, utilizado en los ratones Cre de la invención, es menos eficaz que el promotor de CMV murino equivalente [18]. Tanto la expresión ubicua como la expresión condicional del gen Cre muestra una variación en la eficacia [19,20] y esto puede explicar por qué la delección mediada por Cre del locus del gen C sólo pudo lograrse con éxito en una proporción variada de células y tejidos que producen un patrón de mosaico. No obstante, la delección del gen C puede lograrse de forma temprana para asegurar un desarrollo modificado de la línea germinal que permita la producción mediante cruzamiento de ratones homocigóticos sin genes C remanentes.

Los experimentos demuestran que la eliminación de todos los genes C silencia el locus de IgH a nivel transcripcional, pero no en la etapa de redistribución del ADN. Esto implica que la activación del locus se mantiene totalmente y, en efecto, los niveles de células B tempranas en la etapa de diferenciación de pro- a precélulas B, c-*Kit*⁺ B220⁺ y CD43⁺ B220⁺, son comparables a los de los ratones normales. No obstante, con la falta de células CD43⁺ B220⁺ (véase la figura 16), se logra un bloqueo completo en el desarrollo en la etapa de preB-II cuando las cadenas H de Ig redispuestas deben transcribirse y expresarse. La tinción de poblaciones de células B de médula ósea y bazo con anticuerpos específicos para marcadores de diferenciación revela un patrón de desarrollo muy similar para ratones μ MT y C Δ que también se confirma a nivel de ADN, en el que ambas razas muestran una extensa redistribución (referencia 14 y figura 17). Sin embargo, con respecto a la expresión de Ig existen diferencias fundamentales entre las razas C Δ y μ MT que no son evidentes utilizando un análisis de citometría de flujo del desarrollo de células B, en el que las poblaciones pequeñas de células B maduras pueden escapar a la detección. El hecho de que estas células B maduras estén presentes en la médula ósea de ratones μ MT, pero no en ratones C Δ , se hace evidente en reacciones de RT-PCR. En este caso, los ratones C Δ parecen no producir transcripciones de IgH, que están presentes en abundancia en células de la médula ósea de ratones μ MT. Para excluir cualquier

accidente, se produjo ADNc para la identificación de las transcripciones de Ig con cebadores J_H internos. Esto evitó la amplificación selectiva del ARN poliadenilado, un producto de cadena H poco probable en ratones C Δ que carecen de la región 3' no traducida fundamental para el procesamiento y la expresión de ARN. La expresión de Ig puede identificarse en el suero de ratones μ MT, pero no en ratones C Δ , que muestran una falta completa de Ig en ELISA. Esto estableció que, con la eliminación de todos los genes C, el locus de IgH se hace completamente inoperativo a nivel transcripcional después de completar la redistribución del ADN. De manera inesperada, los inventores han identificado una cantidad significativa de IgG en el suero de los animales μ MT a niveles que no se habían observado en ratones μ MT del entorno C57BL/6 [14]. Una razón puede ser que los ratones μ MT mantenidos como una colonia de cría durante mucho tiempo han perdido el entorno B57BL/6, y así permiten la expresión de IgG [12,13]. Sin embargo, los niveles intermedios de IgA de los ratones μ MT son bastante similares a los niveles indicados para μ MT en el entorno C57BL/6, y el análisis de los ratones individuales mostró que no pueden alcanzarse los niveles de tipo salvaje del entorno BALB/c, al igual que en μ MT [12,13] (los datos no se muestran).

Con respecto a otras estrategias de silenciamiento de la cadena H, la eliminación de agrupaciones de segmentos de genes, tales como todos los genes V, D, J o C, parece garantizar la insuficiencia del locus. Esto se ha demostrado en ratones con delección de J_H, en los que también se ha indicado un bloqueo en el desarrollo de células B en la etapa de precursores de CD43⁺ [9,21], y se descubrió la falta de transcripciones de μ desde el alelo que porta la delección [10]. Un locus de la cadena H disfuncional silencia la expresión de la cadena L, y aunque el locus de Ig κ puede redisponearse al mismo tiempo, o incluso antes que el locus de IgH, sólo se expresa una cadena L productivamente redispuesta tras la producción de la cadena H ([22] y [9] y las referencias citadas allí). En ratones con delección de J_H, la redistribución de C κ en poblaciones de células clasificadas B220⁺ CD43⁺ es bastante similar a los niveles del tipo salvaje, mientras que sólo puede detectarse un nivel bajo de transcripciones de la línea germinal en un análisis de la transferencia Northern [9]. Por el contrario, la eliminación de C μ , el primer gen C expresado y considerado fundamental para dirigir el desarrollo de células B, no produce ratones silenciosos en cadena H [1]. Una probable razón para ello es que la función de un gen C puede ser reemplazada por otro. En ratones con delección de C μ , esto se logra con C δ , y en la sustitución de C γ 2a, un gen C quizás menos importante más cadena abajo, otros C γ asumen la responsabilidad [4]. De manera similar, la eliminación de C δ fue bien tolerada y quizás compensada por un aumento en la expresión de Ig μ [2]. La suposición de que la maduración de células B después de la redistribución del ADN puede depender de manera crucial de la expresión de Ig μ surgió de modelos de ratones transgénicos, en los que en las estrategias iniciales, C μ era el único gen C en un locus de IgH introducido en la configuración de la línea germinal ([23] y las referencias citadas allí). Sin embargo, esto no implica que otros genes C, por ejemplo C γ , no puedan iniciar procesos del desarrollo similares, que podrían ser desentrañados cuando se produzcan ratones con delecciones de C μ y C δ . La sugerencia de que quizás un sistema inmunológico más primitivo o evolutivamente antiguo pueda estar funcionando surge de la observación de que la IgA se expresa en ratones μ MT silenciados [14], y de que los anticuerpos con sólo cadenas H de camélidos no parecen que sobrepasen la etapa de células precursoras de Ig μ [24,25]. Esto puede ensayarse en ratones C Δ mediante la inserción de genes dirigida mediada por Cre-loxP.

Referencias bibliográficas

[1] C. Lutz, *et al.*, IgD can largely substitute for loss of IgM function in B cells, *Nature*, 393 (1998), 797-801.

[2] L. Nitschke, M.H. Kosco, G. Kohler, M.C. Lamers, Immunoglobulin D-deficient mice can mount normal immune responses to thymus-independent and-dependent antigens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 (1993), 1887-1891.

[3] G. Achatz, L. Nitschke, M.C. Lamers, Effect of transmembrane and cytoplasmic domains of IgE on the IgE response, *Science*, 276 (1997), 409-411.

[4] G. Pluschke *et al.*, Generation of chimeric monoclonal antibodies from mice that carry human immunoglobulin C γ 1 heavy or C κ light chain gene segments, *Immunol. Methods*, 215 (1998), 27-37.

[5] Y.R. Zou, W. Müller, H. Gu, K. Rajewsky, Cre-loxP-mediated gene replacement: a mouse strain producing humanized antibodies, *Current Biology*, 4 (1994), 1099-1103.

[6] M. Serwe, F. Sablitzky, V(D)J recombination in B cells is impaired but not blocked by targeted deletion of the immunoglobulin heavy chain intron enhancer, *EMBO J.*, 12 (1993), 2321-2327.

[7] J. Chen, F. Young, A. Bottaro, V. Stewart, R.K. Smith, F.W. Alt, Mutations of the intronic IgH enhancer and its flanking sequences differentially affect accessibility of the J_H locus, *EMBO J.*, 12 (1993), 4635-4645.

[8] M. Cogne *et al.*, A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus, *Cell*, 77 (1994), 737-747.

[9] J. Chen *et al.*, Immunoglobulin gene rearrangement in B cell deficient mice generated by targeted deletion of the J_H locus, *Int. Immunol.*, 5 (1993), 647-656.

- [10] H. Gu, Y.R. Zou, K. Rajewsky, Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting, *Cell*, 73 (1993), 1155-1164.
- [11] D. Kitamura, J. Roes, R. Kuhn, K. Rajewsky, A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin μ chain gene, *Nature*, 350 (1991), 423-426.
- 5 [12] Z. Orinska *et al.*, Novel B cell population producing functional IgG in the absence of membrane IgM expression, *Eur. J. Immunol.*, 32 (2002), 3472-3480.
- [13] M. Hasan, B. Polic, M. Bralic, S. Jonjic, K. Rajewsky, Incomplete block of B cell development and immunoglobulin production in mice carrying the μ MT mutation on the BALB/c background, *Eur. J. Immunol.*, 32 (2002), 3463-3471.
- 10 [14] A.J. Macpherson *et al.*, IgA production without μ or δ chain expression in developing B cells, *Nat. Immunol.*, 2 (2001), 625-631.
- [15] X. Zou, T.A. Piper, J.A. Smith, N.D. Allen, J. Xian, M. Brüggermann, Block in development at the pre-B-II to immature B cell stage in mice without Ig κ and Ig λ light chain, *J. Immunol.*, 170 (2003), 1354-1361.
- 15 [16] T. Nikolic, G.M. Dingjan, P.J. Leenen, R.W. Hendriks, A subfraction of B220⁺ cells in murine bone marrow and spleen does not belong to the B cell lineage but has dendritic cell characteristics, *Eur. J. Immunol.*, 32 (2002), 686-692.
- [17] M. Clamp *et al.*, Ensembl 2002: accommodating comparative genomics, *Nucleic Acids Res.*, 31 (2003), 38-42.
- [18] C.E. Appleby *et al.*, A novel combination of promoter and enhancers increases transgene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and coronary arteries in vivo after adenovirus-mediated gene transfer, *Gene Ther.*, 10 (2003), 1616-1622.
- 20 [19] K. Sakai *et al.*, Stage- and tissue-specific expression of a Col2a1-Cre fusion gene in transgenic mice, *Matrix Biol.*, 19 (2001), 761-767.
- [20] H. Guo *et al.*, Specificity and efficiency of Cre-mediated recombination in Emx1-Cre knock-in mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 273 (2000), 661-665.
- 25 [21] A. Jakobovits *et al.*, Analysis of homozygous mutant chimeric mice: deletion of the immunoglobulin heavy-chain joining region blocks B-cell development and antibody production, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 (1993), 2551-2555.
- [22] T.I. Novobrantseva, V.M. Martin, R. Pelanda, W. Müller, K. Rajewsky, A. Ehlich, Rearrangement and expression of immunoglobulin light chain genes can precede heavy chain expression during normal B cell development in mice, *J. Exp. Med.*, 189 (1999), 75-88.
- 30 [23] M. Brüggermann, Human monoclonal antibodies from translocus mice, en *Molecular Biology of B-cells* (2004), F.W. Alt, T. Honjo, M.S. Neuberger (eds.), pp. 547-561.
- [24] V.K. Nguyen, A. Desmyter, S. Muyldermans, Functional Heavy-chain Antibodies in Camelidae, *Adv. Immunol.*, 79 (2001), 261-269.
- 35 [25] V.K. Nguyen, X. Zou, M. Lauwereyes, L. Brys, M. Brüggermann, S. Muyldermans, Heavy-chain only antibodies derived from dromedary are secreted and displayed by mouse B-cells, *Immunology*, 109 (2003), 93-101.
- [26] B. Sauer, N. Henderson, Targeted insertion of exogenous DNA into the eukaryotic genome by the Cre recombinase, *New Biol.*, 2 (1990), 441-449.
- [27] X. Zou, C. Ayling, J. Xian, T.A. Piper, P.J. Barker, M. Brüggermann, Truncation of the μ heavy chain alters BCR signalling and allows recruitment of CD5⁺ B cells, *Int. Immunol.*, 13 (2001), 1489-1499.
- 40 [28] S. Pettersson, G.P. Cook, M. Brüggermann, G.T. Williams, M.S. Neuberger, A second B cell-specific enhancer 3' of the immunoglobulin heavy-chain locus, *Nature*, 344 (1990), 165-168.
- [29] K.L. Tucker *et al.*, Germ-line passage is required for establishment of methylation and expression patterns of imprinted but not of nonimprinted genes, *Genes Dev.*, 10 (1996), 1008-1020.
- 45 [30] X. Zou, J. Xian, A.V. Popov, I.R. Rosewell, M. Müller, M. Brüggermann, Subtle differences in antibody responses and hypermutation of λ light chains in mice with a disrupted κ constant region, *Eur. J. Immunol.*, 25 (1995), 2154-2162.
- [31] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[32] B. Hogan, R. Beddington, F. Constatini, E. Lacy, *Manipulating the mouse embryo, A Laboratory Manual* (1994), Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[33] A.V. Popov, X. Zou, J. Xian, I.C. Nicholson, M. Brüggemann, A human immunoglobulin λ locus is similarly well expressed in mice and humans, *J. Exp. Med.*, 189 (1999), 1611-1619.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Babraham Institute	
	<120> Células y mamíferos no humanos modificados genéticamente	
5	<130> WPP286912	
	<150> documento GB 0304374.2	
	<151> 26-02-2003	
10	<160> 21	
	<170> PatentIn versión 3.1	
15	<210> 1	
	<211> 64	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<400> 1	
	tttggatcca taacttcgta taatgtatgc tatacgaagt tatcgacctc gaaattctac	60
	cggg	64
	<210> 2	
	<211> 28	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<400> 2	
	tttgatcagc tgatctcggt cttcaggc	28
	<210> 3	
30	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 3	

	aacctgacat gttcctcc	18
	<210> 4	
	<211> 18	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<400> 4	
	gggattagct gagtgtgg	18
	<210> 5	
10	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 5	
15	agagccccct gtctgataag aatctgg	27
	<210> 6	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<400> 6	
	tggatgtgga atgtgtgcga ggc	23
	<210> 7	
	<211> 23	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 7	
	tgctttacgg tatcgccgct ccc	23
30	<210> 8	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	

<400> 8

gagtcctccat ccccaaggct gg

22

<210> 9

<211> 23

5 <212> ADN

<213> Artificial

<400> 9

ggacatgttc agggatcgcc agg

23

10 <210> 10

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

15 <400> 10

gatagctggc tgggtggcaga tgg

23

<210> 11

<211> 28

<212> ADN

20 <213> Artificial

<400> 11

gtagctatatt ctttccaccc agttcttc

28

<210> 12

25 <211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

<400> 12

gtagctatatt ctttccaccc agttcttc

28

30

<210> 13

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

35

	<400> 13		
	gaaaagactt cctctttccc aagtgctc		28
	<210> 14		
	<211> 20		
5	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<400> 14		
	gcatgtctca aagcacaatg		20
10	<210> 15		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<400> 15		
	accctggaca caggaaacac		20
	<210> 16		
	<211> 20		
	<212> ADN		
20	<213> Artificial		
	<400> 16		
	atgggatgga gctggatctt		20
	<210> 17		
25	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<400> 17		
30	atggaatgga gctgggtctt		20
	<210> 18		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		

	<400> 18	
	gagacdgtga shrdrgtbcc tksrcc	26
	<210> 19	
5	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 19	
10	gtatgaggcg gcactaaact ctaa	24
	<210> 20	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<400> 20	
	gaagccactg aagaacacaa atag	24
	<210> 21	
	<211> 24	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<400> 21	
	tacgaaactc caagtcctca gtaa	24
25		

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una célula o un mamífero no humano genéticamente modificado, que se caracteriza porque no comprende una secuencia de ácido nucleico que en sí misma codifique cualquiera de los polipéptidos del locus de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulinas endógenas, y porque están presentes las secuencias de ácidos nucleicos de una o más regiones variables de IgH endógenas, de uno o más segmentos D de IgH endógenas, y de uno o más segmentos J de IgH endógenas.
- 10 2.- Una célula o un mamífero no humano genéticamente modificado, que se caracteriza porque no comprende una secuencia de ácido nucleico que en sí misma codifique cualquiera de los polipéptidos del locus de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulinas endógenas, y porque están presentes todas las secuencias de ácidos nucleicos de la región variable y del segmento D y J de IgH endógenas.
- 3.- Una célula o un mamífero no humano genéticamente modificado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que se caracteriza porque no comprende una secuencia de ácido nucleico que en sí misma codifique cualquiera de los polipéptidos de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulinas (C de IgH).
- 15 4.- Una célula o un mamífero no humano genéticamente modificado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se caracteriza porque todas las secuencias de genes de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulinas están ausentes o parcialmente ausentes del genoma.
- 5.- Una célula o un mamífero no humano genéticamente modificado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza porque puede obtenerse o se obtiene mediante la delección dirigida de todas o fundamentalmente todas las secuencias del gen C de IgH endógenas.
- 20 6.- Una célula o un mamífero no humano genéticamente modificado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza porque puede obtenerse o se obtiene mediante una recombinación *Cre-loxP*.
- 7.- Una célula o un mamífero no humano genéticamente modificado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza porque al menos parte de al menos una secuencia potenciadora del gen C de IgH está presente.
- 25 8.- Una célula o un mamífero no humano genéticamente modificado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza porque una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena está presente dentro del genoma.
- 9.- Una célula o un mamífero no humano genéticamente modificado, que se caracteriza porque tiene una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena cadena abajo o dentro del último gen del locus C de IgH.
- 30 10.- Una célula o un mamífero no humano genéticamente modificado según la reivindicación 9, que se caracteriza porque tiene otra secuencia de recombinación específica de sitio no endógena cadena arriba o dentro del primer gen del locus C de IgH.
- 11.- Una célula o un mamífero no humano genéticamente modificado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza porque uno o más marcadores seleccionables están presentes dentro del genoma.
- 35 12.- Una célula o un mamífero no humano genéticamente modificado según la reivindicación 9, que se caracteriza porque al menos un marcador seleccionable está presente cadena arriba o cadena abajo de la secuencia de recombinación específica de sitio no endógena.
- 13.- Una célula o un mamífero no humano genéticamente modificado según la reivindicación 10, que se caracteriza porque al menos un marcador seleccionable está integrado dentro del genoma cadena arriba y/o cadena abajo de al menos una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena.
- 40 14.- Una célula o un mamífero no humano genéticamente modificado según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que se caracteriza porque el marcador o marcadores seleccionables son uno o más de los marcadores seleccionables seleccionados del grupo que comprende un gen de resistencia a la neomicina, un gen de resistencia a la puromicina, y un gen de resistencia a la higromicina.
- 45 15.- Una célula o un mamífero no humano genéticamente modificado según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, que se caracteriza porque la secuencia de recombinación específica de sitio no endógena es un sitio *loxP*.
- 16.- Un mamífero no humano genéticamente modificado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza porque es un ratón.
- 50 17.- Una célula no humana genéticamente modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que se caracteriza porque es una célula de ratón.
- 18.- Un ratón genéticamente modificado según la reivindicación 16, o una célula de ratón genéticamente modificada

según la reivindicación 17, que se caracteriza porque los ocho genes C de IgH endógenos, μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$, ϵ y α están ausentes o parcialmente ausentes.

19.- Una célula no humana genéticamente modificada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, o las reivindicaciones 17 o 18, que se caracteriza porque es una célula precursora embrionaria.

5 20.- Un método para producir una célula no humana genéticamente modificada, que comprende:

(a) (i) transfectar una célula no humana con una construcción de transporte dirigido para la integración cadena arriba o dentro del primer gen C de IgH del locus C de IgH, comprendiendo dicha construcción de transporte dirigido una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena y un marcador seleccionable, seleccionar una célula en la que el marcador seleccionable está presente, y evaluar dicha célula para la integración de la secuencia de recombinación, y

(ii) transfectar una célula producida en (a) (i) con una construcción de transporte dirigido para la integración cadena abajo o dentro del último gen C de IgH del locus C de IgH, comprendiendo dicha construcción de transporte dirigido un marcador seleccionable y una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena, seleccionar una célula en la que el marcador seleccionable está presente, y evaluar dicha célula para la integración de la secuencia de recombinación; o

(b) (i) transfectar una célula no humana con una construcción de transporte dirigido para la integración cadena abajo o dentro del último gen C de IgH del locus C de IgH, comprendiendo dicha construcción de transporte dirigido una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena y un marcador seleccionable, seleccionar una célula en la que el marcador seleccionable está presente, y evaluar dicha célula para la integración de la secuencia de recombinación, y

(ii) transfectar una célula producida en (b) (i) con una construcción de transporte dirigido para la integración cadena arriba o dentro del primer gen C de IgH del locus C de IgH, comprendiendo dicha construcción de transporte dirigido una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena y un marcador seleccionable, seleccionar una célula en la que el marcador seleccionable está presente, y evaluar dicha célula para la integración de la secuencia de recombinación; o

(c) cotransfectar una célula no humana con una construcción de transporte dirigido para la integración cadena arriba o dentro del primer gen C de IgH del locus C de IgH, y con una construcción de transporte dirigido para la integración cadena abajo o dentro del último gen C de IgH del locus C de IgH, comprendiendo cada una de dichas construcciones de transporte dirigido una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena y teniendo cada una un marcador seleccionable, seleccionar una célula en la que el marcador o marcadores seleccionables están presentes, y evaluar dicha célula para la integración de la secuencia de recombinación; y opcionalmente,

(d) proporcionar a una célula obtenida en (a) (ii), (b) (ii) o (c) una recombinasa activa en la secuencia de recombinación específica de sitio no endógena, y opcionalmente evaluar para acontecimientos de delección.

21.- Un método según la reivindicación 20, que se caracteriza porque la secuencia de recombinación específica de sitio no endógena es un sitio *loxP*.

22.- Un método según la reivindicación 21, que se caracteriza porque, en la etapa opcional (d), la recombinasa es una recombinasa Cre.

23.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, que se caracteriza porque la recombinasa se proporciona mediante un vector de expresión.

24.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, que se caracteriza porque la célula no humana genéticamente modificada es una célula de ratón.

25.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, que se caracteriza porque la célula no humana genéticamente modificada es una célula precursora embrionaria.

26.- El uso de una célula precursora embrionaria de la reivindicación 19 para la producción de un mamífero no humano genéticamente modificado.

27.- Un método para producir un mamífero no humano genéticamente modificado, que se caracteriza porque una célula precursora embrionaria de la reivindicación 19 se introduce en un blastocito hospedante y se desarrolla en un animal quimérico.

28.- Un método según la reivindicación 27, que se caracteriza por:

(a) introducir una célula precursora embrionaria de mamífero no humano según la reivindicación 19 en un blastocito de mamífero no humano compatible; y

(b) transplantar el blastocito obtenido en (a) a una madre de acogida que es un mamífero no humano compatible para obtener un mamífero no humano quimérico, y opcionalmente seleccionar el marcador o marcadores seleccionables y/o la secuencia o secuencias de recombinación específica de sitio no endógenas y/o la delección de fundamentalmente todas las secuencias del gen C de IgH endógenas.

5 29.- Un método para producir un mamífero no humano genéticamente modificado que se caracteriza por realizar un método de la reivindicación 27 o 28 para obtener un mamífero no humano quimérico, y cruzar dicho mamífero no humano quimérico para obtener una progenie heterocigótica.

30.- Un método para producir un mamífero no humano genéticamente modificado que se caracteriza por realizar un método de la reivindicación 29 para obtener una progenie heterocigótica, y cruzar entre sí dicha progenia heterocigótica para obtener una progenie homocigótica.

31.- Un método para producir un mamífero no humano genéticamente modificado que se caracteriza por realizar un método de la reivindicación 30 para obtener un mamífero no humano genéticamente modificado homocigótico para la integración de una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena cadena arriba o dentro del primer gen C de IgH del locus C de IgH, y cruzar dicho mamífero no humano genéticamente modificado homocigótico para la integración de una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena cadena arriba o dentro del primer gen C de IgH del locus C de IgH, con un mamífero no humano genéticamente modificado compatible homocigótico para la integración de una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena cadena abajo o dentro del último gen C de IgH del locus C de IgH, para obtener una progenie heterocigótica, y opcionalmente cruzar entre sí la progenie heterocigótica para obtener una progenie homocigótica para ambas integraciones.

32.- Un método según la reivindicación 31, que se caracteriza porque comprende además cruzar la progenie homocigótica para ambas integraciones con un mamífero no humano compatible capaz de expresar una recombinasa activa en la secuencia de recombinación específica de sitio no endógena para obtener una progenie; y opcionalmente seleccionar la progenie obtenida para la delección del gen C de IgH.

33.- Un método según la reivindicación 31 o la reivindicación 32, que se caracteriza porque la secuencia o secuencias de recombinación específica de sitio no endógenas son sitios *loxP*.

34.- Un método según la reivindicación 33, que se caracteriza porque la recombinasa es una recombinasa Cre.

35.- Un método según la reivindicación 33, que se caracteriza porque comprende además cruzar la progenie heterocigótica u homocigótica para *loxP* en ambos loci con un mamífero no humano compatible capaz de expresar la recombinasa Cre para obtener una progenie de mamíferos no humanos que no comprenda una secuencia de ácido nucleico que en sí misma codifique cualquiera de los polipéptidos de la región constante de cadena pesada de Ig endógenos en uno o ambos alelos.

36.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 35, que se caracteriza porque las secuencias de ácidos nucleicos de una o más regiones variables de IgH endógenas, de uno o más segmentos D de IgH endógenos, y de uno o más segmentos J de IgH endógenos están presentes en la progenie.

37.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 36, que se caracteriza porque todas las secuencias de ácidos nucleicos de la región variable y del segmento D y J de IgH endógenas están presentes en la progenie.

38.- Un método para producir un mamífero no humano genéticamente modificado capaz de expresar uno o más genes exógenos, que se caracteriza por realizar un método de una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37 para obtener un mamífero no humano genéticamente modificado según las reivindicaciones 1 a 7, o las reivindicaciones 10 a 16, o la reivindicación 18, que no comprende una secuencia de ácido nucleico que en sí misma codifique cualquiera de los polipéptidos de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulinas endógenos, y cruzar dicho mamífero no humano genéticamente modificado según las reivindicaciones 1 a 7, o las reivindicaciones 10 a 16, o la reivindicación 18, con un mamífero no humano compatible que codifica y es capaz de expresar uno o más genes exógenos, para obtener una progenie heterocigótica para dicho uno o más genes exógenos, y opcionalmente cruzar entre sí la progenie heterocigótica para producir una progenie homocigótica para dicho uno o más genes exógenos.

39.- Un método para producir una célula o un mamífero no humano genéticamente modificado capaz de expresar uno o más genes exógenos, que se caracteriza porque comprende la introducción de uno o más genes exógenos en una célula de mamífero no humano según las reivindicaciones 1 a 7, o las reivindicaciones 10 a 15, o las reivindicaciones 17 o 18, que no comprende una secuencia de ácido nucleico que en sí misma codifique cualquiera de los polipéptidos de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulinas endógenos.

40.- Un método según la reivindicación 39, que se caracteriza porque la célula de mamífero no humana es una célula precursora embrionaria.

41.- Un método según la reivindicación 40, que se caracteriza porque dicho uno o más genes exógenos se

introducen mediante transfección.

42.- Un método según la reivindicación 39, que se caracteriza porque la célula de mamífero no humana es un oocito (célula huevo).

5 43.- Un método según la reivindicación 42, que se caracteriza porque dicho uno o más genes exógenos se introducen mediante microinyección de ADN.

44.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 39 a 43, que se caracteriza porque dicho uno o más genes exógenos se insertan en el genoma de la célula o del mamífero no humano.

45.- Un método según la reivindicación 44, que se caracteriza porque dicho uno o más genes exógenos se insertan en una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena.

10 46.- Un método para producir un mamífero no humano genéticamente modificado capaz de expresar uno o más genes exógenos, que se caracteriza por realizar un método según una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37 para obtener un mamífero no humano que no comprende una secuencia de ácido nucleico que en sí misma codifique cualquiera de los polipéptidos de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulinas endógenas, y porque están presentes las secuencias de ácidos nucleicos de una o más regiones variables de IgH endógenas, de uno o más segmentos D de IgH endógenos, y de uno o más segmentos J de IgH endógenos, y cruzar dicho mamífero no humano obtenido de este modo con un mamífero transgénico no humano que tiene uno o más genes exógenos asociados o flanqueados por una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena y que tiene una recombinasa activa en la secuencia de recombinación específica de sitio no endógena, para obtener una progenie, y opcionalmente seleccionar la progenie para la inserción de dicho uno o más genes exógenos.

20 47.- Un método para producir un mamífero no humano genéticamente modificado capaz de expresar uno o más genes exógenos, que se caracteriza por realizar un método según una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37 para obtener un mamífero no humano que no comprende una secuencia de ácido nucleico que en sí misma codifique cualquiera de los polipéptidos de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulinas endógenas, y porque están presentes todas las secuencias de ácidos nucleicos de la región variable, los segmentos D y J de IgH endógenas, y cruzar dicho mamífero no humano obtenido de este modo con un mamífero transgénico no humano que tiene uno o más genes exógenos asociados o flanqueados por una secuencia de recombinación específica de sitio no endógena y que tiene una recombinasa activa en la secuencia de recombinación específica de sitio no endógena, para obtener una progenie, y opcionalmente seleccionar la progenie para la inserción de dicho uno o más genes exógenos.

30 48.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 43 a 47, que se caracteriza porque la secuencia de recombinación específica de sitio no endógena es una secuencia *loxP*, y la inserción es mediante integración de *Cre-loxP*.

49.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 38 a 48, que se caracteriza porque el mamífero no humano genéticamente modificado es un ratón.

35 50.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 38 a 49, que se caracteriza porque el gen o genes exógenos son un gen de IgH o genes de IgH.

51.- Un método según la reivindicación 50, que se caracteriza porque el gen o genes de IgH son un gen C de IgH o genes C de IgH.

40 52.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 38 a 51, que se caracteriza porque el gen o genes exógenos son un gen humano o genes humanos.

53.- Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 52, que se caracteriza porque los genes exógenos son un locus de cadena pesada de Ig humano que tiene regiones V, D, J y/o C.

54.- Un método según la reivindicación 53, en el que las regiones V, D, J y/o C del locus de cadena pesada de Ig humano están en la configuración de la línea germinal.

45 55.- Un método según la reivindicación 53, en el que las regiones V, D, J y/o C del locus de cadena pesada de Ig humano están productivamente dispuestas.

56.- Un método para la producción de inmunoglobulinas exógenas que comprende un método según una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 55.

50 57.- Un método para la producción de inmunoglobulinas humanas que comprende un método según una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 55.

58.- Un método según la reivindicación 56 o 57, en el que el mamífero no humano es un roedor.

59.- Un método según la reivindicación 56 o 57, en el que el mamífero no humano es un ratón.

60.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 56 o 57, en el que la célula no humana es una célula de roedor.

61.- Un método según la reivindicación 56 o 57, en el que la célula no humana es una célula de ratón.

5 62.- Un método para la producción de un medicamento que comprende un método según una cualquiera de las reivindicaciones 56 a 61.

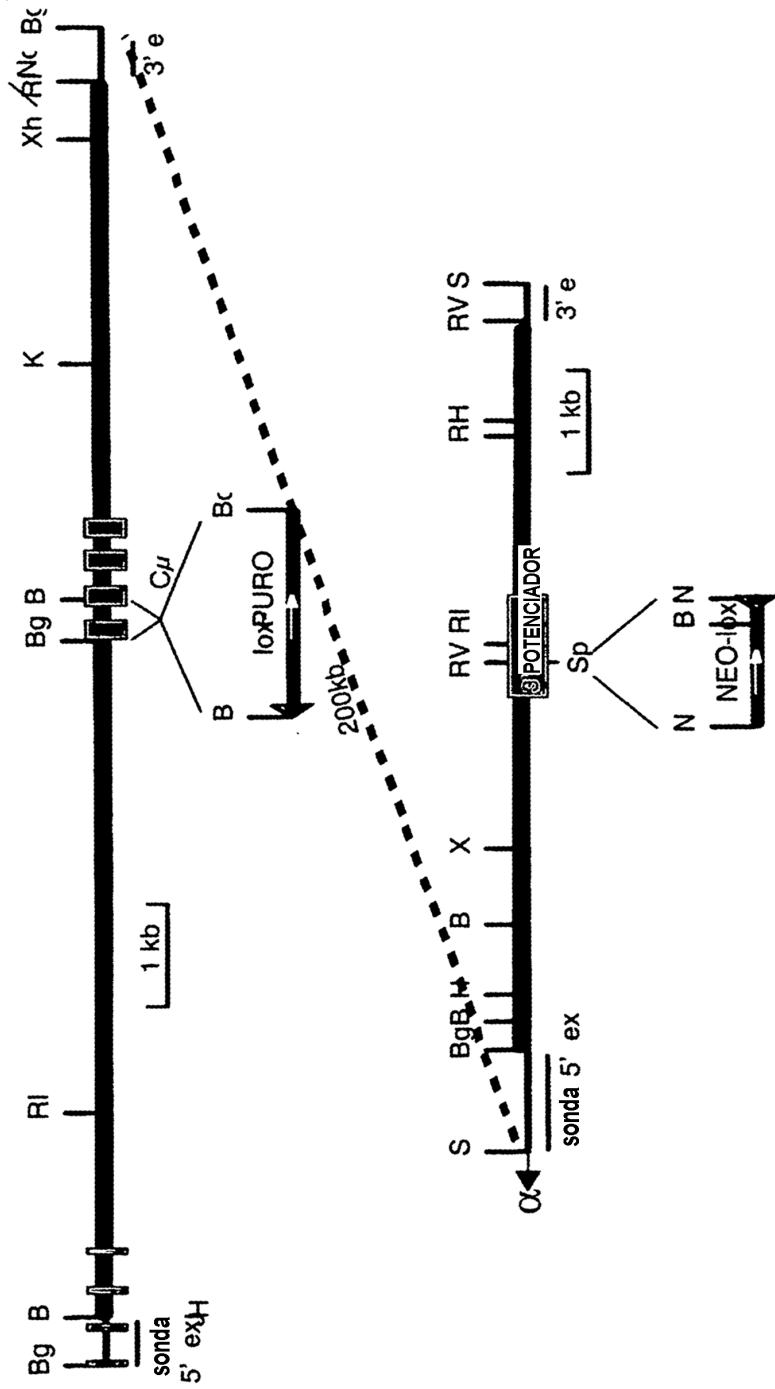


Figura 1

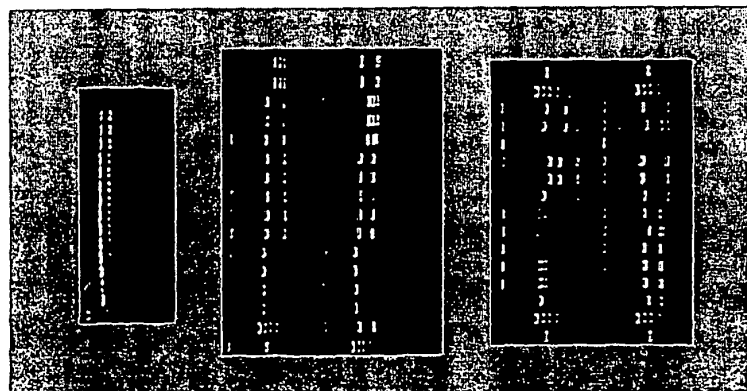
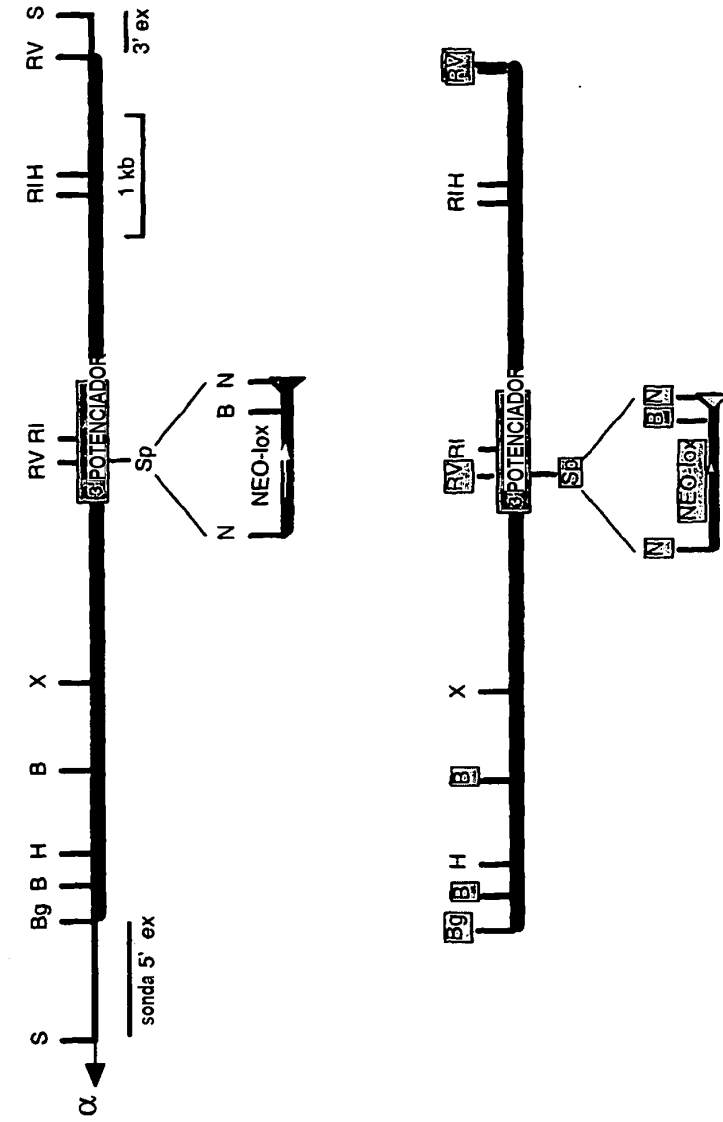


Figura 2

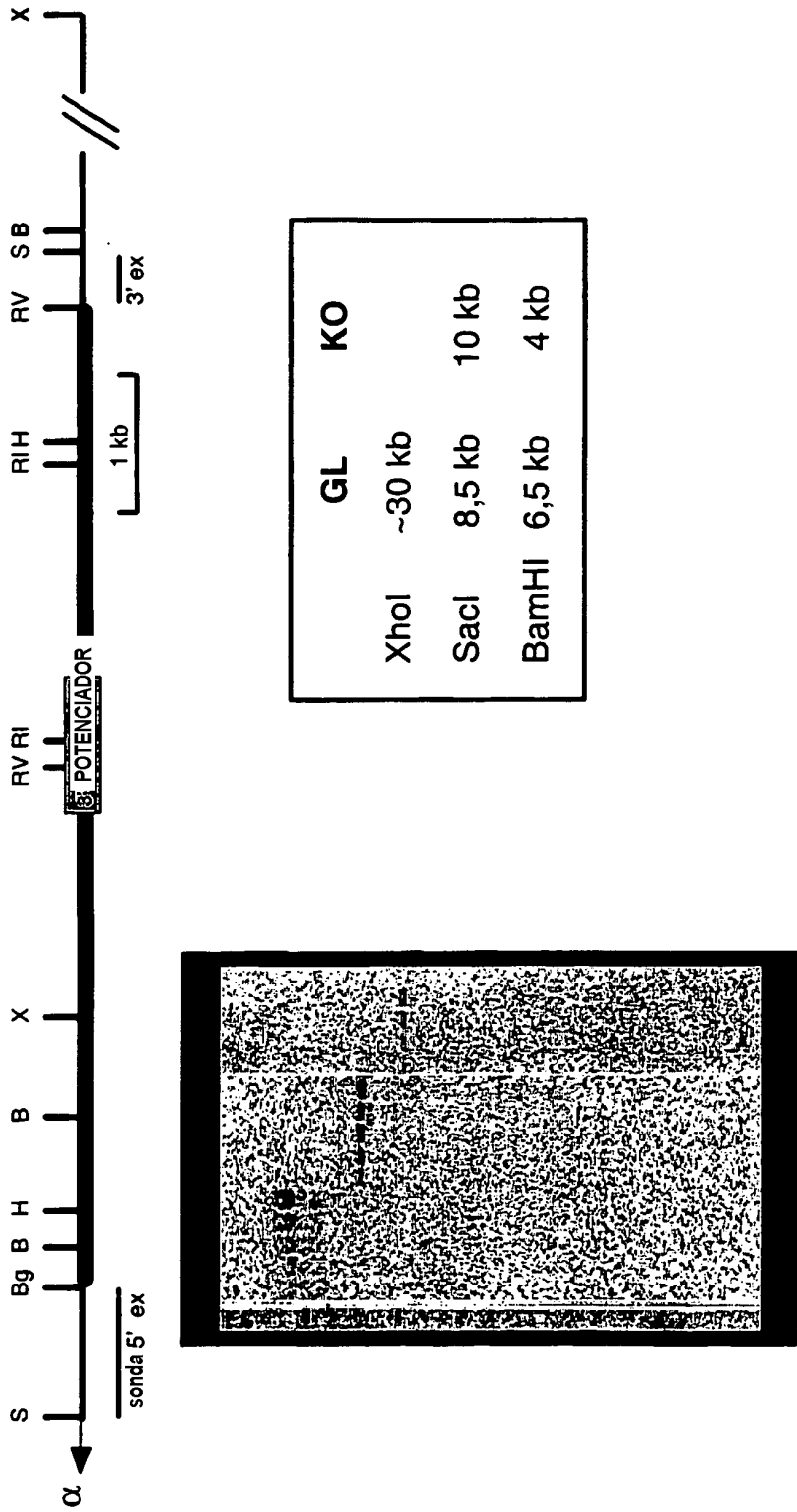


Figura 3

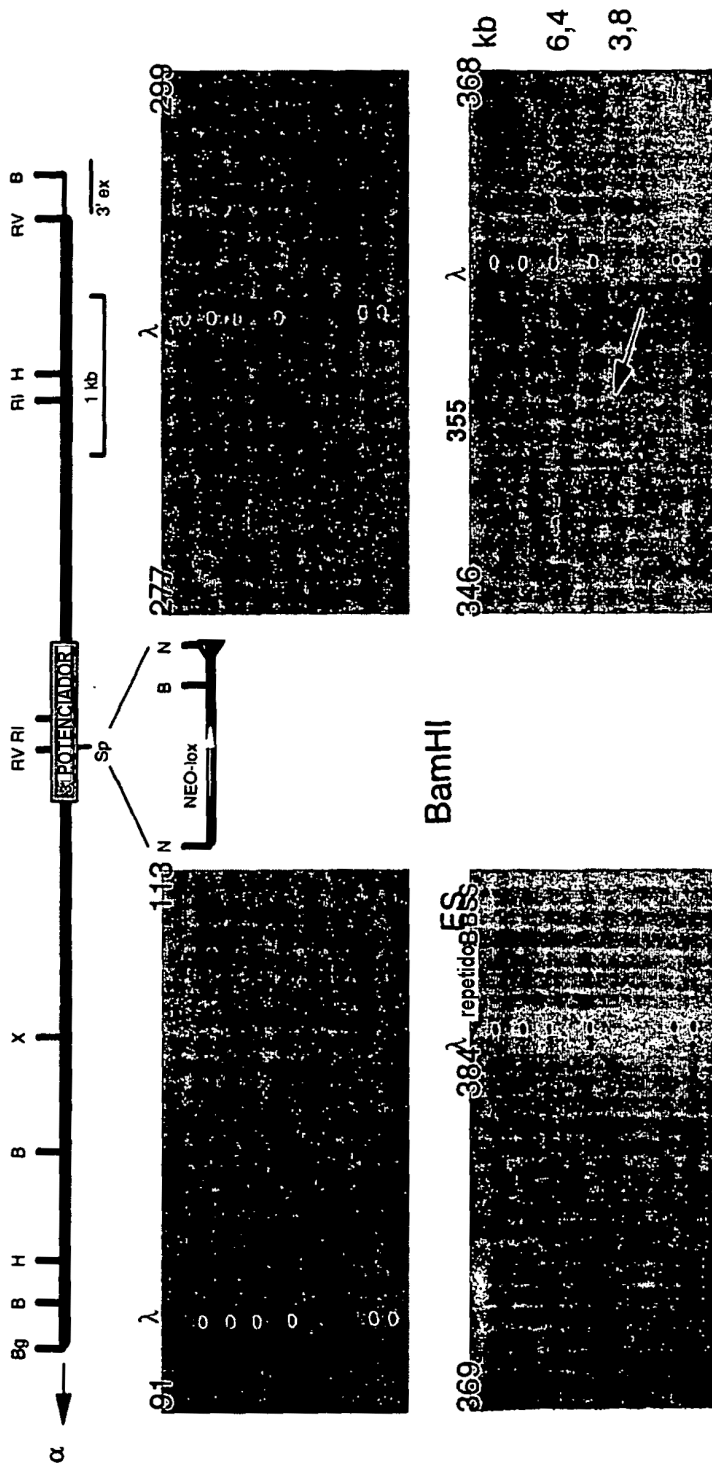


Figura 4

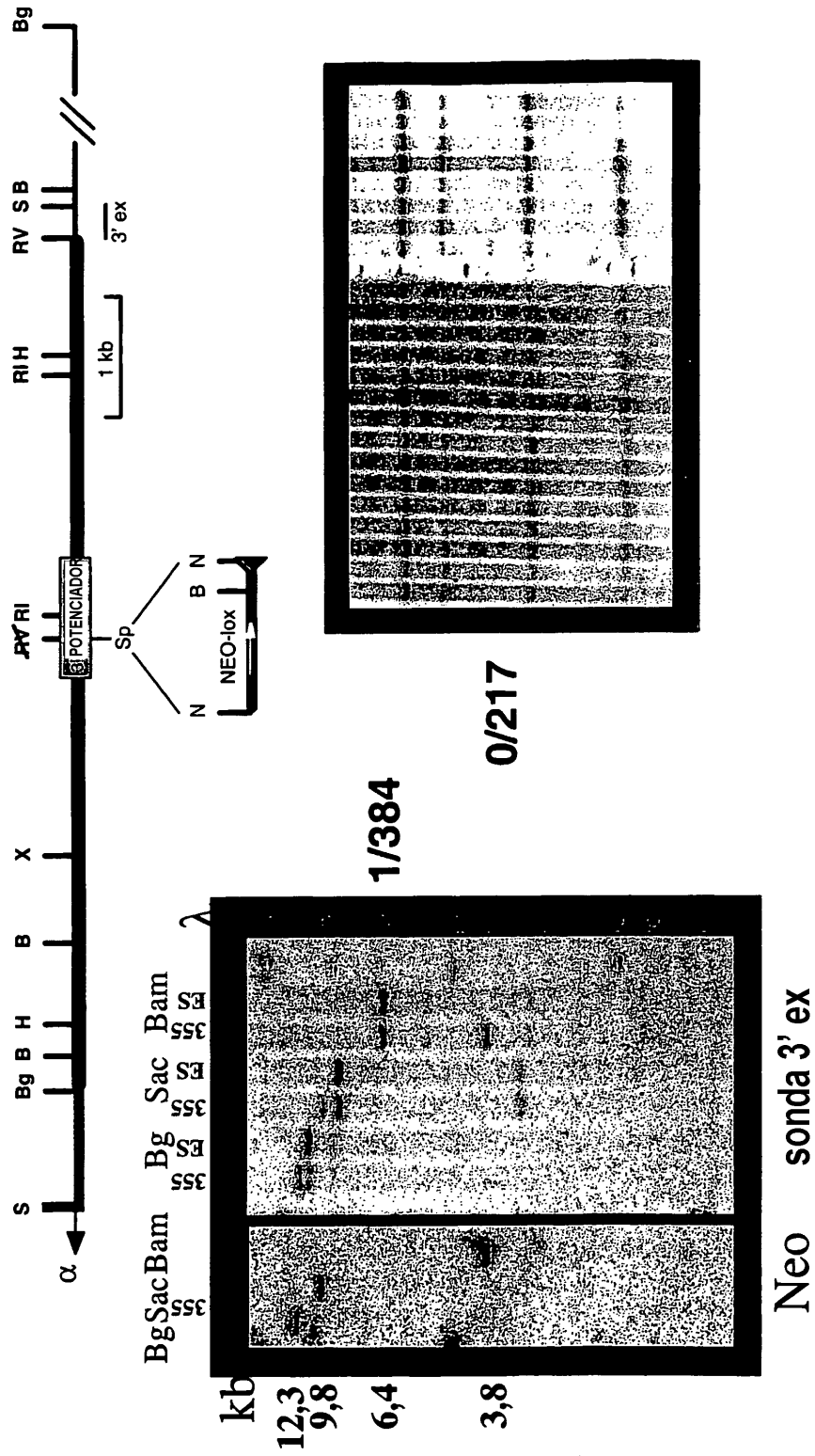


Figura 5

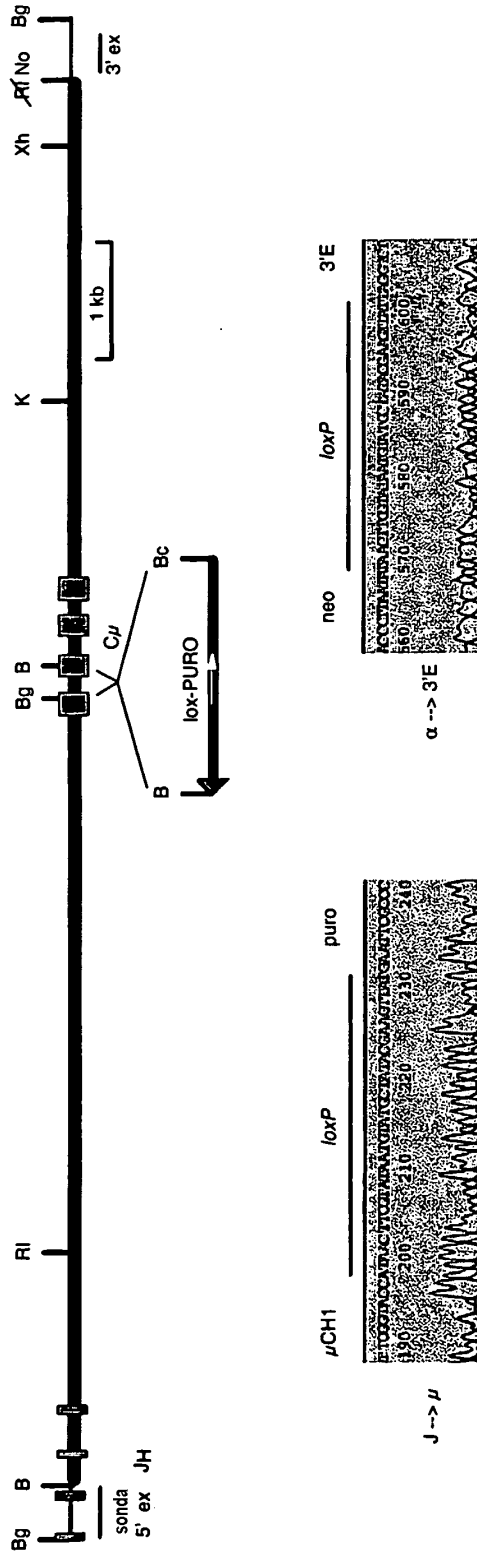


Figura 6

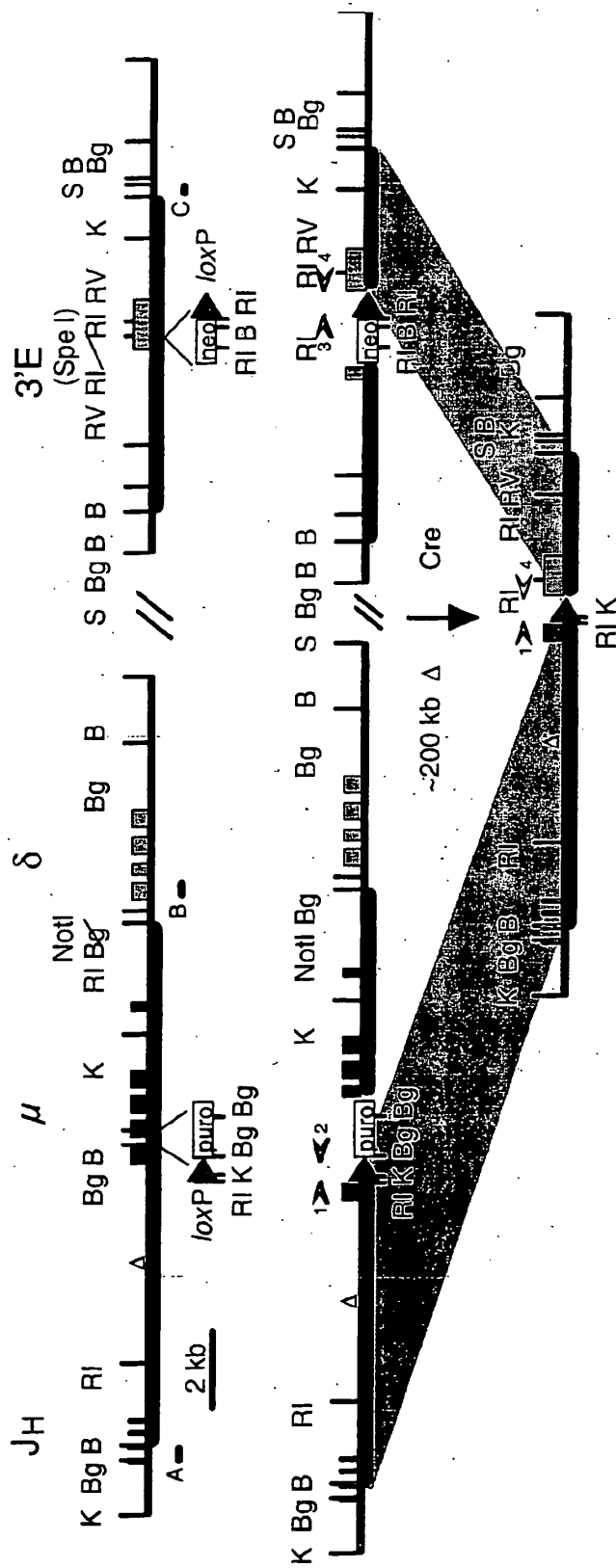
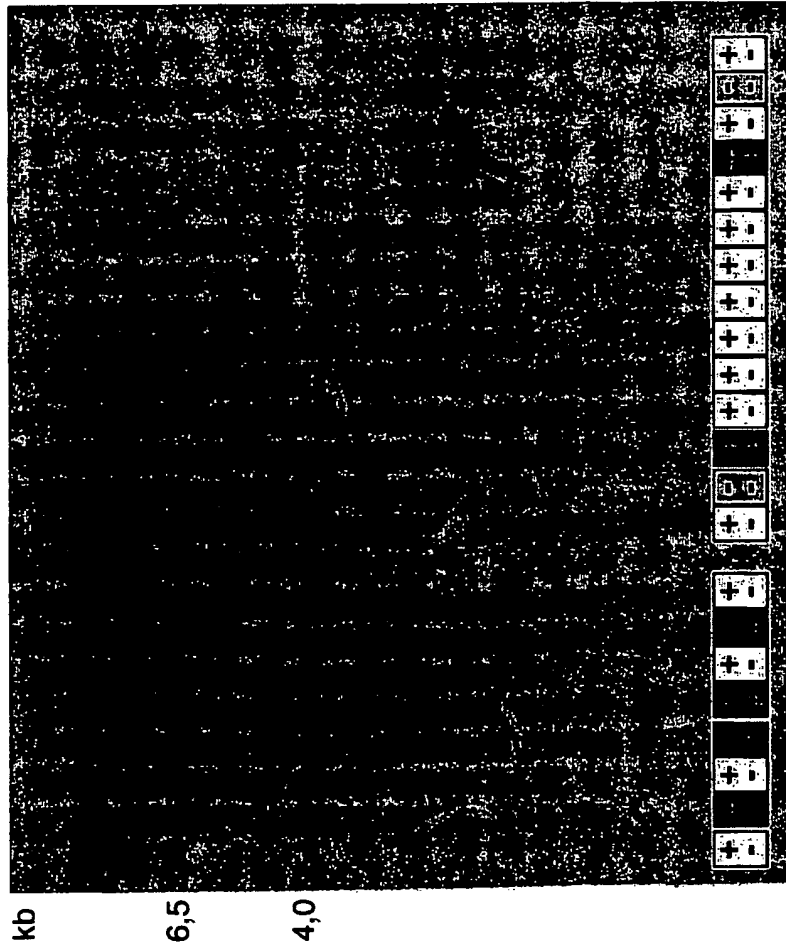


Figura 7



digerido BamHI, sonda 3' externa E

Figura 8

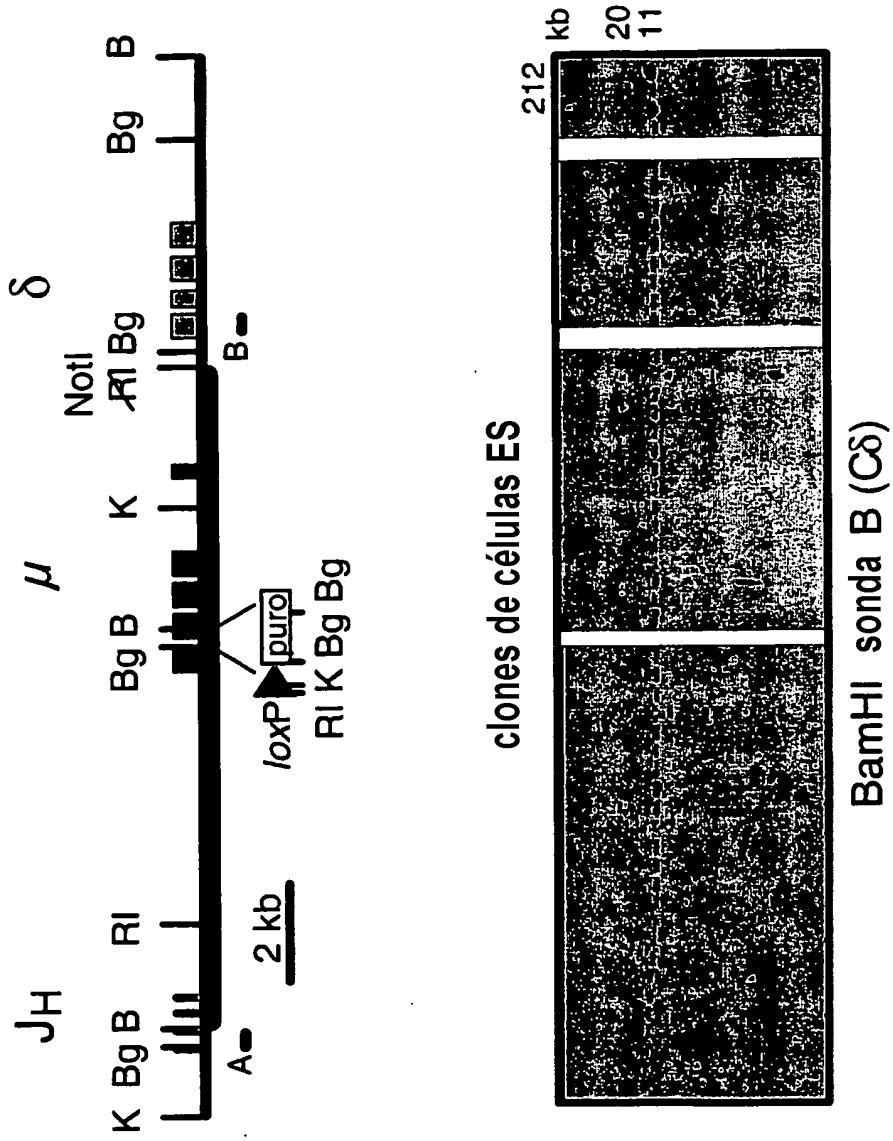


Figura 9

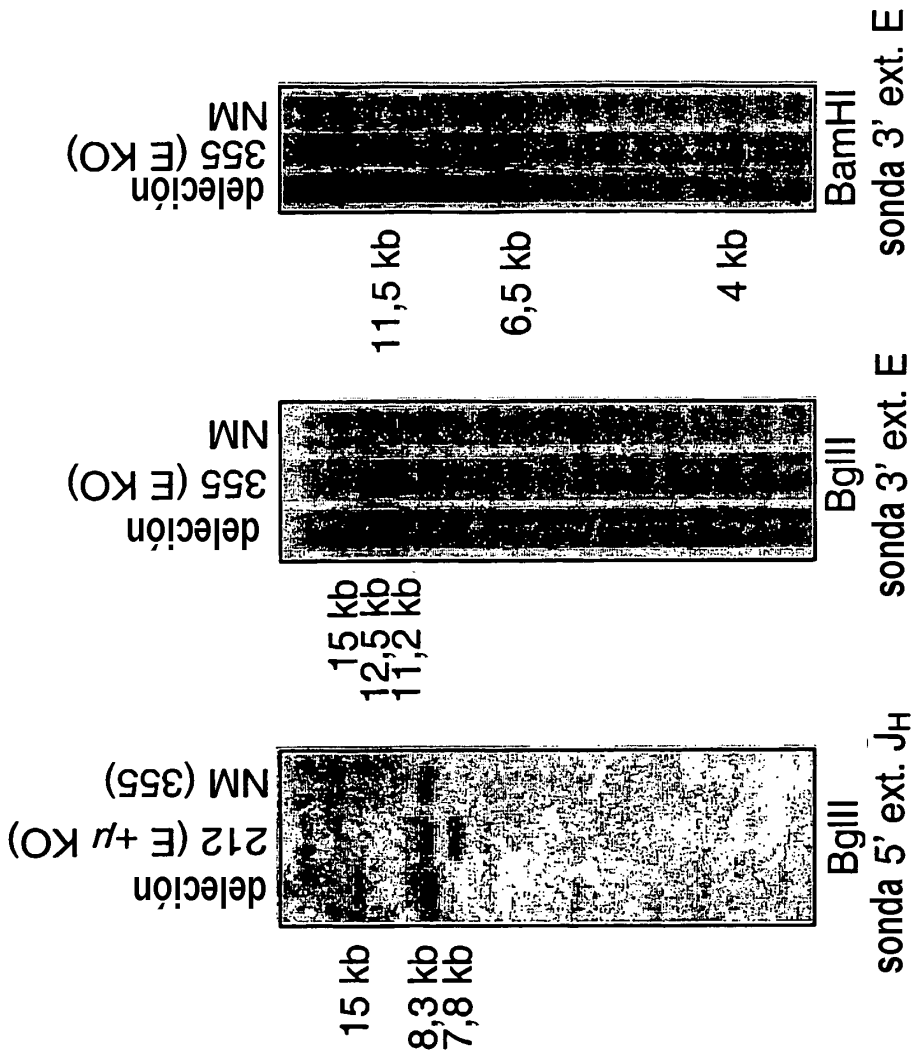


Figura 10

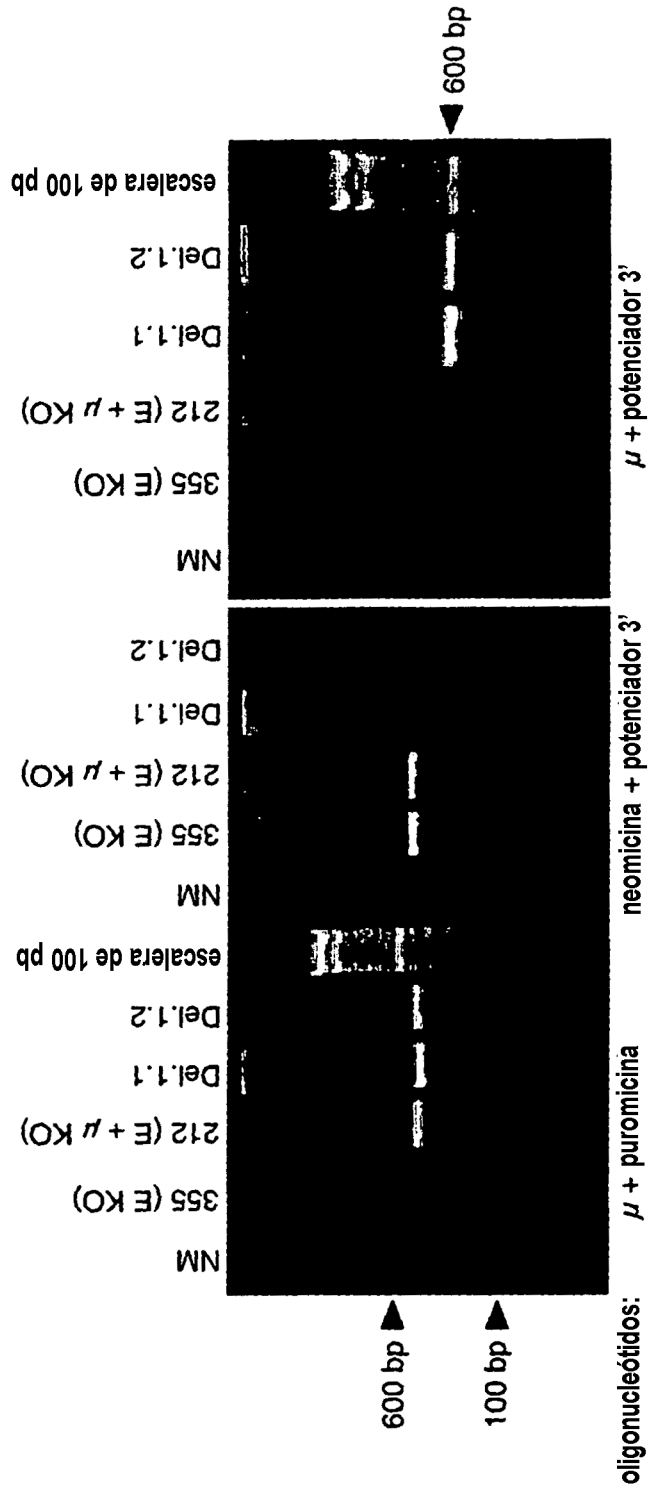


Figura 11

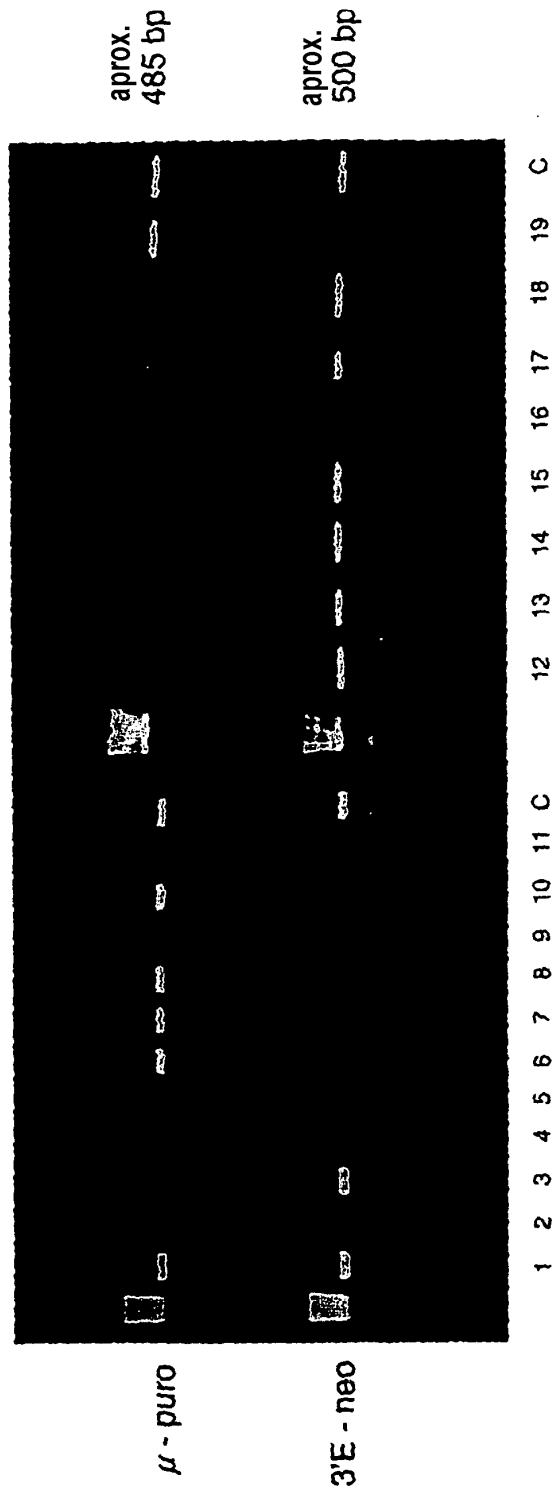


Figura 12

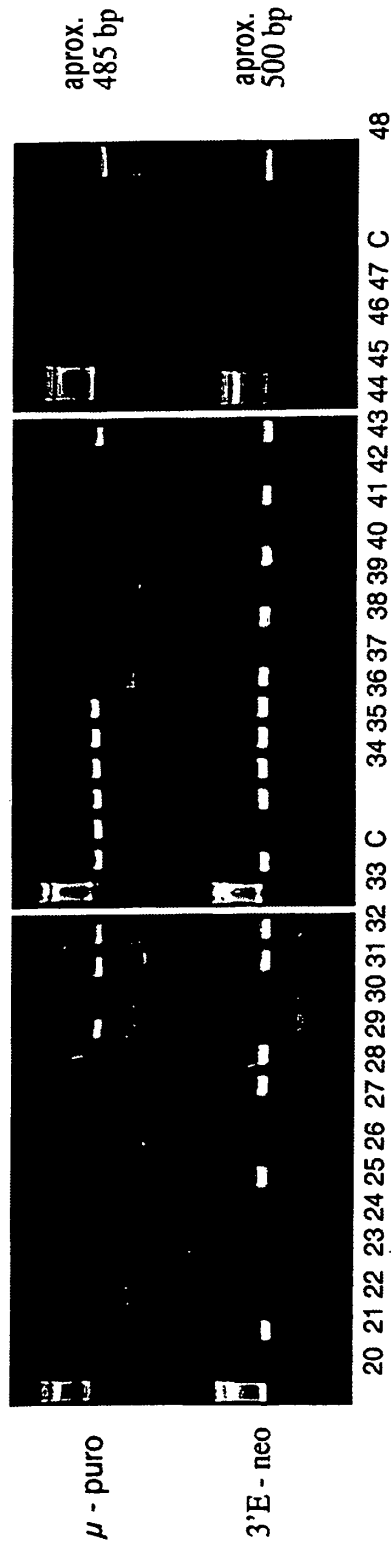
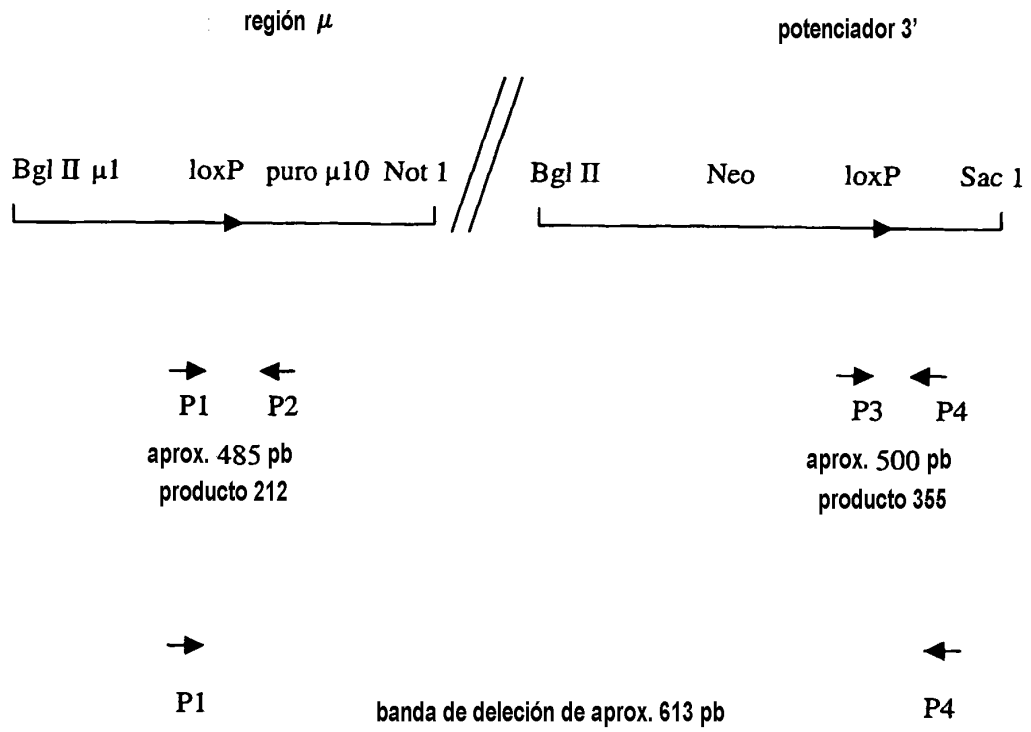


Figura 13

Figura 14



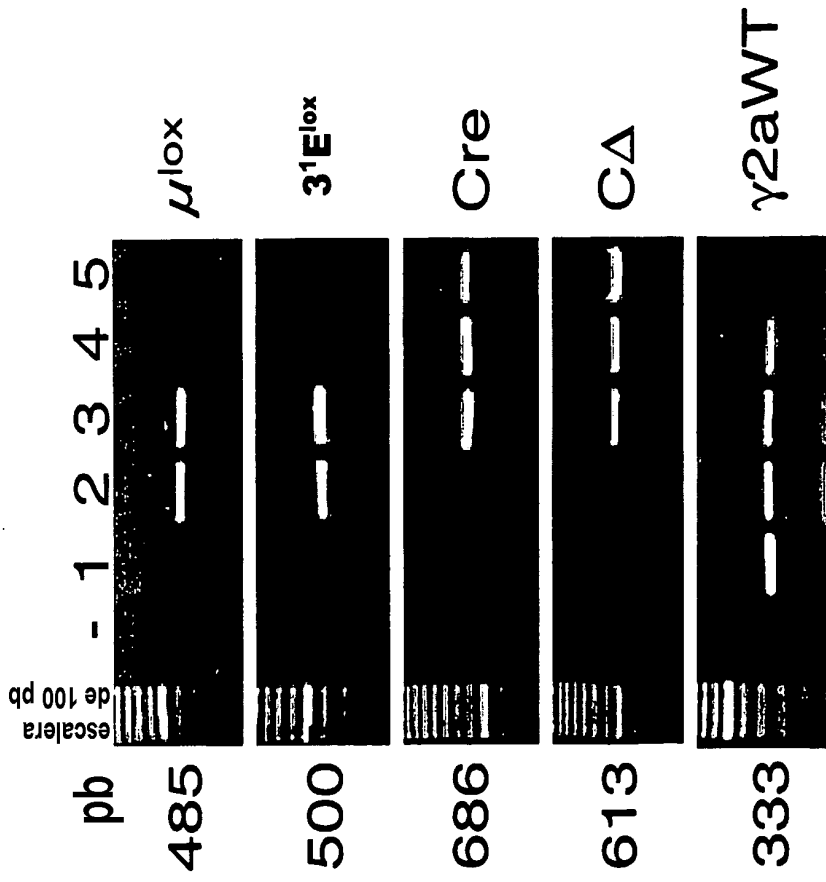


Figura 15

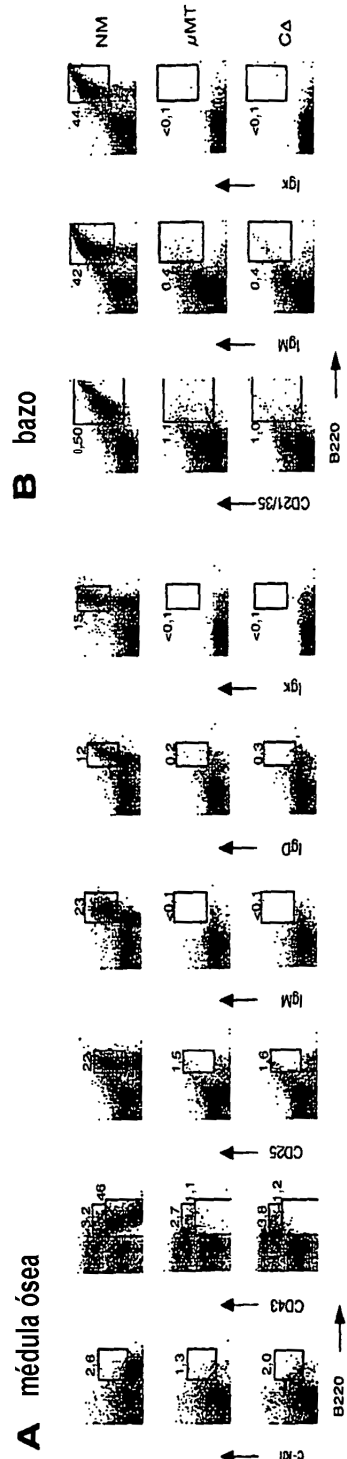


Figura 16

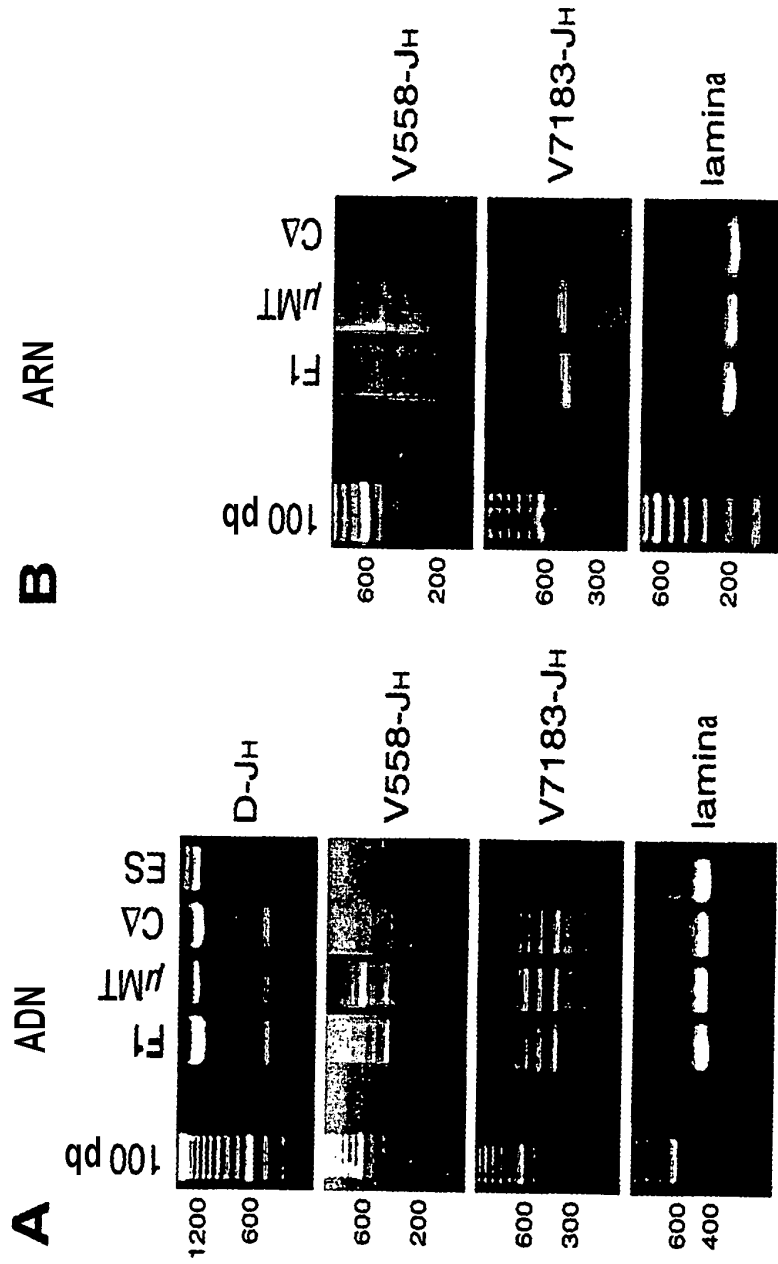


Figura 17

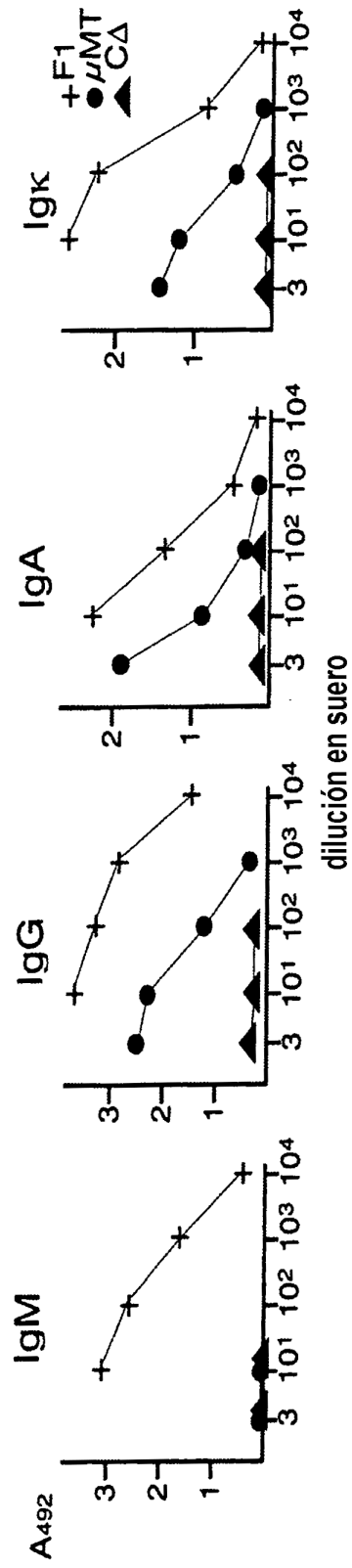


Figura 18