

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 251**

51 Int. Cl.:
C12N 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01994325 .7**
96 Fecha de presentación: **19.12.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1409646**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2004**

54 Título: **Animales transgénicos que comprenden un sistema inmunitario humanizado**

30 Prioridad:
19.12.2000 US 256591 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.10.2012

73 Titular/es:
**ALTOR BIOSCIENCE CORPORATION (100.0%)
2810 NORTH COMMERCE PARKWAY
MIRAMAR, FLORIDA 33025, US**

72 Inventor/es:
**BELMONT, HEATHER, J.;
WONG, HING, C.;
WITTMAN, VAUGHAN, P. y
WEIDANZ, JON, A.**

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, Isabel

ES 2 389 251 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

Animales transgénicos que comprenden un sistema inmunitario humanizado

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a animales transgénicos no humanos capaces de producir receptores de células T (TCRs) humanos funcionales, moléculas heterólogas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) y moléculas correceptoras, así como a métodos y transgenes para producir los animales transgénicos. Los animales y proteínas heterólogas producidos son útiles para una variedad de aplicaciones, incluyendo el desarrollo de nuevos compuestos terapéuticos y vacunas.

Antecedentes de la invención

10 La industria biofarmacéutica se ha construido sobre el éxito del desarrollo de agentes proteicos como compuestos terapéuticos, por ejemplo para tratar enfermedades en seres humanos y animales. El desarrollo de compuestos biofarmacéuticos ha estado conducido por el uso de tecnología de ADN recombinante o ingeniería genética para clonar y expresar las proteínas de interés y manipular mediante ingeniería su fabricación a escala comercial. El campo ha evolucionado hasta el punto en el que se reconoce y acepta que las proteínas producidas para uso en seres humanos deberían contener tanta más secuencia humana como sea posible para asegurarse que el compuesto terapéutico proteico será menos probable que provoque una respuesta de anticuerpo en el paciente tratado. Esto ha conducido a una serie de desarrollos para producir proteínas más completamente humanas.

20 El sistema de respuesta inmunitaria humano es un sistema de defensa muy complejo y eficiente frente a organismos invasores. Recientemente, ha habido un aumento de interés en el uso de componentes del sistema inmunitario del propio cuerpo como agentes terapéuticos para modular o inducir un ataque inmunitario en un estado de enfermedad, o para inhibir un ataque en un trastorno autoinmunitario. Las moléculas terapéuticas que imitan a componentes del sistema inmunitario nativos se integrarían en los mecanismos de defensa naturales del cuerpo y de este modo proporcionarían un método eficiente de tratamiento para tales enfermedades. Como resultado de tales esfuerzos, se ha desarrollado recientemente un número de productos de anticuerpos, y se han aprobado como compuestos terapéuticos para uso humano. Muchos de estos se desarrollaron originalmente como anticuerpos monoclonales murinos; sin embargo, los anticuerpos murinos provocan generalmente una respuesta de anticuerpo anti-ratón de humano (HAMA) en la que el sistema inmunitario del paciente produce anticuerpos frente al anticuerpo terapéutico. En respuesta a tales efectos, se desarrollaron métodos para crear anticuerpos quiméricos o anticuerpos "humanizados", en los que las regiones constantes murinas o las regiones de armazón del anticuerpo se sustituyeron por secuencias humanas. Otro enfoque ha sido crear animales transgénicos en los que los genes de los anticuerpos murinos se han suprimido o inactivado y se han sustituido por genes de anticuerpos humanos (Lonberg y Kay, patente US 5.877.397, Kucherlapati et al. US 6.150.584 A, Abgenix Inc. documento WO 98/24893 A2). Estos animales transgénicos son capaces de producir anticuerpos humanos en respuesta a la vacunación.

35 Las células T son las células efectoras primarias implicadas en la respuesta celular. Al igual que los anticuerpos se han desarrollado como compuestos terapéuticos, (TCRs), los receptores sobre la superficie de las células T, que les dan su especificidad, tienen ventajas únicas como plataforma para desarrollar compuestos terapéuticos. Aunque los anticuerpos están limitados para el reconocimiento de patógenos en la sangre y espacios extracelulares, o para dianas proteicas sobre la superficie celular, los TCRs reconocen antígenos presentados por moléculas de MHC sobre las superficies de las células (incluyendo antígenos derivados de proteínas intracelulares). Dependiendo del subtipo de células T que reconocen el antígeno presentado y se activan, los TCRs y los TCRs que poseen células T participan en el control de diversas respuestas inmunitarias. Por ejemplo, las células T auxiliares están implicadas en la regulación de la respuesta inmunitaria humoral a través de la inducción de la diferenciación de células B en células que segregan anticuerpos. Además, las células T auxiliares activadas inician respuestas inmunitarias mediadas por células mediante células T citotóxicas. De este modo, los TCRs reconocen específicamente dianas que no son vistas normalmente por anticuerpos, y también disparan a las células T que poseen para iniciar una amplia variedad de respuestas inmunitarias.

50 Una célula T reconoce un antígeno presentado sobre las superficies de las células por medio de los TCRs expresados sobre su superficie celular. Los TCRs son heterodímeros enlazados mediante disulfuro, consistiendo la mayoría en glucoproteínas de cadenas α y β . Las células T usan mecanismos de recombinación para generar diversidad en sus moléculas receptoras similares a aquellos mecanismos para generar diversidad de anticuerpos que operan en células B (Janeway y Travers, Immunobiology 1997). Similar a los genes inmunoglobulínicos, los genes de TCR están compuestos de segmentos que se reordenan durante el desarrollo de las células T. Los polipéptidos de TCR consisten en regiones variables, constantes, transmembránicas y citoplásmicas. Mientras que la región transmembránica ancla la proteína, y la región intracelular participa en la señalización cuando el receptor está ocupado, la región variable es responsable del reconocimiento específico de un antígeno, y la región constante mantiene la superficie de unión de la región variable. La cadena α de TCR contiene regiones variables codificadas por segmentos variables (V) y de unión (J) solamente, mientras que la cadena β contiene segmentos de diversidad (D) adicionales.

Los segmentos V, D y J de las cadenas de PCR están presentes en múltiples copias en ADN de la línea germinal. La diversidad del repertorio de células T y la capacidad para reconocer diversos antígenos se genera a través de un proceso de recombinación al azar que da como resultado la unión de un miembro de cada familia de segmentos para generar una única molécula que codifica una única cadena α o β de TCR. Aunque este proceso de reordenamiento se produce en ambos alelos en la célula T, la exclusión alélica da como resultado sólo un TCR expresado por célula T (Janeway y Travers, Immunobiology, 1997).

Un TCR reconoce un antígeno peptídico presentado sobre las superficies de células presentadoras de antígenos en el contexto de moléculas auto-(MHC). Dos tipos diferentes de moléculas del MHC reconocidas por TCRs están implicados en la presentación de antígenos. Las moléculas del MHC de clase I y las moléculas del MHC de clase II. Los subconjuntos de células T maduras se definen por las moléculas correceptoras que expresan. Estos correceptores actúan conjuntamente con los TCRs en el reconocimiento del complejo de MHC-antígeno y la activación de la célula T. Las células T auxiliares maduras reconocen antígeno en el contexto de moléculas del MHC clase II, y se distinguen por tener el correceptor CD4. Las células T citotóxicas reconocen antígeno en el contexto de determinantes del MHC clase I, y se distinguen por tener el correceptor CD8.

Debido a la especificidad de los TCRs y su capacidad para reconocer diversas amenazas e iniciar una respuesta inmunitaria natural, actualmente los TCRs se están evaluando para uso como una plataforma para desarrollar compuestos terapéuticos. En un ejemplo, los TCRs humanos se conjugan químicamente a un fármaco contra el cáncer, a fin de usar la especificidad del TCR para guiar y suministrar el fármaco a células que el TCR puede reconocer. En otro ejemplo, el gen de TCR se fusiona genéticamente (o se conjuga químicamente) a una proteína biológicamente activa (por ejemplo citocina, quimiocina o linfocina), y de este modo suministra o dirige el agente activo hacia el sitio de acción por medio de la especificidad de TCR. En un tercer ejemplo, los TCRs están enlazados a un anticuerpo específico para un tipo celular, de manera que el anticuerpo puede reclutar una célula efectora y dirigir o guiar a la célula efectora hacia la vecindad de la célula diana, que el TCR reconoce. En un ejemplo adicional, se ha desarrollado una estirpe celular de hibridoma de célula T murina que carece de cadenas de TCR endógenas, que expresa las regiones variables α y β y la región constante β humana (Chung S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1994). En todavía otro ejemplo, se han desarrollado ratones transgénicos que contienen un único gen de cadena β de TCR humano reordenado, que es específico para un péptido particular (Rothe J. et al., International Immunology, 1993; Viney J.L. et al., Hybridoma, 1992).

Las complicaciones encontradas cuando se usan anticuerpos no humanos como compuestos terapéuticos proporcionan justificación amplia para el deseo de usar TCRs humanos como la base para compuestos terapéuticos de TCR para uso humano. Los TCRs humanos deberían reducir significativamente las oportunidades de desarrollar una respuesta de anticuerpo frente al compuesto terapéutico a base de TCR, y mejorar las interacciones funcionales necesarias para el inicio de una respuesta inmunitaria eficiente y deseada mediada por células. De este modo, una consecuencia de los esfuerzos de desarrollar compuestos terapéuticos a base de TCR es un interés en tener los medios para provocar la producción de TCRs humanos apropiados para uso en el desarrollo de tales compuestos terapéuticos.

Un método actual para aislar TCRs que reconocen y reaccionan con un antígeno deseado se basa en vacunar un hospedante con una proteína o péptido antigénico a fin de provocar una respuesta de célula T, o encontrar una fuente inmunizada naturalmente que exprese células T adecuadas. Una vez que se crea o se identifica una fuente apropiada, las células T específicas para el antígeno deseado se pueden propagar, inmortalizar y seleccionar para identificar un TCR apropiado.

Los actuales enfoques para la identificación y producción de TCRs humanos presentan dificultades para grupos que requieran receptores muy específicos. Estos enfoques son medios laboriosos, caros y que consumen tiempo para identificar y producir TCRs deseados. Adicionalmente, los enfoques descritos no siempre dan como resultado la selección de los TCRs que pueden reconocer efectivamente un antígeno específico de interés. Además, hay limitaciones obvias en el uso de vacunaciones experimentales a fin de provocar respuestas de células T humanas. Finalmente, los TCRs que reconocen autoantígenos (los autoantígenos son sobreexpresados a menudo en células cancerosas) no se encuentran a menudo en abundancia debido a efectos de tolerancia.

Una limitación adicional de los actuales enfoques es el aislamiento de TCRs específicos de afinidad elevada. La generación de moléculas de TCR humanas, independientes de correceptores, puede dar como resultado TCRs de afinidad elevada que serían más eficaces reconociendo y participando en interacciones funcionales con péptido antigénico presentado en el contexto de moléculas del MHC humanas.

A la vista de lo anterior, es manifiesto que existe la necesidad de un método para obtener moléculas de TCR humanas que sean funcionales, que reconozcan antígenos específicos de interés, y que se puedan producir fácilmente y en cantidades significativas. Por lo tanto, sería deseable tener métodos para manipular mediante ingeniería la producción eficiente de TCRs heterólogos.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a animales no humanos transgénicos y a métodos para obtenerlos que son capaces de producir TCR humano con un repertorio de TCR sustanciales, que comprenden loci de receptores de células T endógenos inactivados que son loci de receptores de cadenas α y β ; y transgenes contenidos en su genoma compuestos de loci de receptores de células T humanos que son loci de receptores de cadenas α y β , en el que dichos loci de receptores de células T humanos no están reordenados. Tales animales transgénicos son capaces de producir un repertorio de células T que expresan TCRs humanos. La inmunización del animal transgénico con una proteína o péptido de interés permite la producción de células T específicas para ese antígeno. Además, la invención proporciona la producción de TCRs independientes de correceptores que producen moléculas de afinidad elevada, eficientes y discriminatorias capaces de participar efectivamente en interacciones funcionales.

En un aspecto de la invención, los animales no humanos transgénicos tienen loci de TCRs endógenos inactivados que son loci de receptores de cadenas α y β y poseen en el genoma transgenes que codifican loci de TCRs humanos heterólogos que son loci de receptores de cadenas α y β . Los loci de TCRs inactivados son las cadenas α y β de TCRs endógenos que se pueden inactivar a través de una interrupción funcional que puede incluir la supresión de una cualquiera de las regiones V, D, J o C. Como alternativa, la interrupción funcional puede incluir mutaciones o supresiones de regiones reguladoras tales como la región promotora del gen.

Los transgenes heterólogos del animal codifican loci α y β no reordenados del TCR humano que son capaces de sufrir reordenamiento funcional de los genes V, D, J o C de los loci de manera que el animal transgénico es capaz de producir TCRs humanos funcionales que son necesarios para la modulación de células T. Los animales no humanos transgénicos de la invención también son capaces de producir un repertorio de TCRs humanos que se unen a antígenos particulares con especificidad y afinidad elevada.

En una realización, el animal transgénico no humano también posee en el genoma al menos un transgén que tiene secuencias de genes del MHC humanos (HLA) contenidos en el transgén. El transgén puede contener una porción de genes HLA, tal como HLA-A2. Más preferiblemente, el transgén puede contener todos los genes HLA humanos para las moléculas del MHC clase I o del MHC clase II. Todavía más preferiblemente, el animal transgénico no humano portará transgenes que contienen secuencias de todos los genes del MHC humanos, clase I y clase II, de manera que el animal tendrá la capacidad para producir una amplia variedad de moléculas del MHC para permitir la presentación de una variedad de péptidos antigénicos a las células T. Los genes que codifican MHC contenidos en los transgenes pueden estar no reordenados, parcialmente reordenados, o completamente reordenados con respecto a la secuencia de la línea germinal del locus, en tanto que se obtenga apropiadamente en el animal transgénico la expresión de las moléculas deseadas. Los TCRs de cadenas α y β heterólogos producidos por los animales facilitan el reconocimiento y reacción de la célula T con el complejo que presenta molécula del MHC heterólogo-antígeno a fin de iniciar una respuesta inmunitaria frente al antígeno.

Otra realización de la invención incluye al menos un gen que codifica uno de los dos tipos de moléculas correceptoras que están incluidas en el genoma de los animales transgénicos descritos anteriormente. Preferiblemente, el animal transgénico poseerá y expresará genes para ambos correceptores CD4 y CD8. La presencia de correceptores expresados facilita adicionalmente la respuesta de células T generada por antígeno presentado por molécula del MHC heterólogo. Los correceptores incorporados en el complejo de TCR heterólogo reconocen de forma diferencial moléculas del MHC (complejos CD4-TCR reconocen preferentemente complejos del MHC clase II, mientras que los complejos CD8-TCR reconocen preferentemente complejos del MHC clase I), están altamente sensibilizados a complejos del MHC que presentan antígeno, e inician respuesta inmunitaria frente al antígeno de manera más eficiente que los complejos del TCR solos.

Las moléculas heterólogas producidas, tales como TCRs o MHCs, son moléculas humanas. Sin embargo, las moléculas heterólogas derivadas de otras fuentes pueden servir para fines análogos. Por ejemplo, las moléculas heterólogas derivadas de un animal particular tal como un perro o un caballo, por ejemplo, se pueden usar para el desarrollo de compuestos terapéuticos veterinarios.

Un hospedante de animal transgénico no humano preferido para la presente invención es un ratón; sin embargo, cualquier animal que se pueda manipular transgénicamente y tenga un sistema inmunitario capaz de llevar a cabo los sucesos de recombinación y expresión requeridos de la presente invención puede servir como hospedante de animal transgénico no humano. Los animales adicionalmente preferidos incluyen, pero no se limitan a, rata, chimpancé, otros primates, cabra, cerdo, o pez cebra.

Otro aspecto de la invención incluye métodos para producir animales transgénicos no humanos capaces de producir TCR humano con un repertorio de TCR sustancial. La inactivación de loci de receptores de células T endógenos que son loci de receptores de cadenas α y β , y la inserción de transgenes que codifican loci de receptores de células T humanos heterólogos, que son loci de cadenas α y β , son necesarias para la producción de los animales. Esto se puede lograr mediante un número de etapas. Un animal se puede producir a partir de un embrión no humano o célula madre embrionaria que haya tenido los loci de TCR endógenos, que son loci de cadenas α y β funcionalmente interrumpidos y posean transgenes que contienen loci de TCR α y β humanos heterólogos.

Los loci endógenos interrumpidos de animales no humanos comprenden además en realizaciones preferidas loci del MHC de clase I, del MHC de clase II, CD4 y/o CD8. Los genes endógenos se pueden interrumpir a través de uno

5 cualquiera de un número de medios. Preferiblemente, la interrupción se puede producir mediante la incorporación por recombinación homóloga de secuencias seleccionadoras de dianas que interrumpen la secuencia específica para el locus. En el locus α o β de TCR, esto puede incluir seleccionar como diana una supresión de secuencias requeridas, tales como las regiones V, D, J, o C. Como alternativa, las interrupciones seleccionadas como dianas pueden provocar una mutación o supresión en el promotor u otra secuencia reguladora que da como resultado una interrupción funcional del locus. Otro método preferido puede incluir el uso del sistema de recombinación *cre-lox* o métodos antisentido para provocar una interrupción funcional de la expresión del locus.

10 Los transgenes portados por los animales comprenden además en realizaciones preferidas transgenes que contienen loci del MHC clase I y/o del MHC clase II heterólogos, y/o genes CD4 y CD8. Los transgenes que contienen loci de TCR heterólogos engloban las secuencias de línea germinal de las regiones V, D, y/o J, y C de las cadenas α y β de los loci de TCR. Las secuencias no están reordenadas, a fin de permitir la producción de diversas especies de TCRs. Los transgenes también pueden incluir secuencias reguladoras de los loci, a fin de mantener el funcionamiento del transgén. Las secuencias reguladoras pueden derivar de la misma fuente heteróloga que las secuencias génicas. Como alternativa, las secuencias reguladoras pueden derivar de la especie endógena.

15 Otro método preferido para producir los animales transgénicos no humanos incluye la creación de animales transgénicos no humanos a partir de embriones no humanos o de células madre embrionarias no humanas que tienen un locus interrumpido o un transgén insertado. La creación del animal transgénico no humano consiste entonces en reproducir un animal con una interrupción con otro animal que contiene la misma interrupción para crear animales de progenie que son homocigotos para la interrupción. Con la creación de los homocigotos, estos animales se reproducen con animales homocigotos que tienen otra interrupción deseada, y se selecciona la progenie que tiene interrupciones dobles homocigotas. De forma similar, se crean animales que poseen dos transgenes reproduciendo animales que poseen cada uno en sus respectivos genomas un transgén de interés. Un animal que posee interrupciones y transgenes endógenos se puede producir mediante la reproducción de los animales seleccionados que poseen interrupciones homocigotas con animales que tienen los transgenes contenidos en su genoma, y su progenie se puede seleccionar para que tenga mutaciones dobles homocigotas y que posea transgenes de interés. No es necesario llevar a cabo las etapas de reproducción en el orden mencionado anteriormente. Antes bien, la reproducción de los animales se puede llevar a cabo en cualquier orden en tanto que se obtenga la selección del genotipo deseado en los animales de la progenie.

Las moléculas de ácido nucleico sirven como constructos transgénicos que codifican moléculas heterólogas.

30 Los transgenes de la invención incluyen constructos de TCR y/o MHC heterólogos. Constructos transgénicos adicionales incluyen los correceptores CD4 y/o CD8.

35 Los transgenes de la invención incluyen un transgén de cadena β de TCR que comprende ADN que codifica al menos un segmento génico V, al menos un segmento génico D, al menos un segmento génico J y al menos un segmento génico de la región C. La invención también incluye un transgén de cadena α de TCR que comprende ADN que codifica al menos un segmento génico V, al menos un segmento génico J y al menos un segmento génico de la región C. Los segmentos génicos que codifican los segmentos génicos de las cadenas α y β son heterólogos para el animal no humano transgénico, por cuanto que derivan de, o corresponden a, secuencias de ADN de línea germinal de segmentos génicos α y β de TCR procedentes de una especie que no consiste en el animal hospedante no humano.

40 En una realización de la invención, los transgenes de TCR α y β heterólogos comprenden fragmentos relativamente grandes de ADN heterólogo no reordenado (es decir, no reordenado para codificar una cadena α o β de TCR funcional). Preferiblemente todos los genes de los loci α y β están incluidos en los transgenes. Tales fragmentos comprenden típicamente una porción sustancial de los segmentos C, J (y en el caso de la cadena β , D) de un locus de TCR heterólogo. Además, tales fragmentos también comprenden una porción sustancial de los segmentos génicos V. Tales transgenes no reordenados permiten la recombinación de los segmentos génicos (reordenación funcional) y la expresión de las cadenas α y/o β de TCR reordenadas resultantes en el animal no humano transgénico cuando dicho animal se expone a antígeno, para generar un repertorio de TCRs. Como alternativa, los transgenes pueden comprender loci de TCR parcialmente reordenados o completamente reordenados, a fin de producir un subconjunto de TCRs.

45 Tales constructos transgénicos pueden comprender adicionalmente secuencias reguladoras, por ejemplo promotores, potenciadores, señales de recombinación, y similares, que corresponden a secuencias derivadas del ADN heterólogo. Como alternativa, tales secuencias reguladoras se pueden incorporar en el transgén a partir de la misma especie o una especie relacionada del animal no humano usado en la invención. Por ejemplo, los segmentos génicos de TCR humanos se pueden combinar en un transgén con una secuencia potenciadora de TCR de roedor para uso en un ratón transgénico.

Otra realización de la invención incluye transgenes de loci de MHC heterólogos. Los transgenes de MHC comprenden secuencia de ADN que codifica al menos una molécula de MHC heterólogo, tal como HLA-A2. Son más preferidos los transgenes que codifican algunas o todas de una clase de moléculas del MHC clase I o del MHC clase II. Algunos o todos los transgenes pueden incluir secuencias de loci de MHC de línea germinal. Los transgenes de

MHC pueden ser genes reordenados, parcialmente reordenados, o no reordenados, de manera que el animal no humano que posee el transgén es capaz de expresar las moléculas codificadas.

5 Todavía otra realización de la invención incluye transgenes correceptores. Los transgenes correceptores comprenden secuencia de ADN que codifica moléculas correceptoras con un dominio extracelular de un gen correceptor enlazado a un dominio transmembránico y citoplásmico de un gen correceptor, en el que los dominios pueden ser de fuentes homólogas o heterólogas. Estos transgenes correceptores pueden incluir CD4 y/o CD8.

10 En una realización preferida, los loci de MHC (MHC clase I y/o MHC clase II) y los correceptores CD4 y/o CD8 derivan de la misma fuente heteróloga. Como alternativa, los loci de MHC y los correceptores pueden derivar de fuentes estrechamente relacionadas. Adicionalmente, los correceptores CD4 y/o CD8 pueden ser genes quiméricos, en los que el dominio extracelular derivado de una fuente heteróloga está fusionado a un dominio transmembránico y citoplásmico de una fuente heteróloga diferente, o una fuente homóloga.

15 Las moléculas de ácido nucleico a usar en la invención para interrumpir los loci endógenos en el animal no humano utilizan segmentos homólogos de ADN, preferiblemente en un vector con marcadores de selección positiva y negativa, que se construye de manera que selecciona como diana la interrupción funcional de un locus. La interrupción seleccionada como diana incluye una clase de segmentos génicos que codifican un TCR de cadena α y/o β endógeno para el animal no humano usado en la invención. Tales segmentos génicos endógenos pueden incluir segmentos génicos de las regiones D, J y C. Se pueden seleccionar como dianas secuencias adicionales, por ejemplo secuencias reguladoras tales como, por ejemplo, el promotor en el que una interrupción seleccionada como diana dará como resultado la pérdida de función del locus.

20 Realizaciones adicionales incluyen la interrupción seleccionada como diana de loci MHC endógenos (MHC clase I y/o clase II), y/o loci correceptores, CD4 y/o CD8.

25 Se incluyen métodos para utilizar la invención. El vector de selección positiva-negativa se pone en contacto con al menos un embrión no humano o célula madre embrionaria de un animal no humano, tras lo cual se seleccionan las células, en el que el vector de selección positiva-negativa se ha integrado en el genoma del animal no humano por medio de recombinación homóloga. Después del trasplante, el animal no humano transgénico resultante es sustancialmente incapaz de montar una respuesta inmunitaria mediada por TCR endógeno como resultado de la integración homóloga del vector en el ADN cromosómico. Tales animales no humanos inmunodeficientes se pueden usar después para estudiar deficiencias inmunitarias, estudiar la función de células T pasiva, para modelos para el estudio de cáncer y compuestos terapéuticos contra el cáncer, o se pueden usar como el receptor de transgenes heterólogos.

30 Las células T procedentes de tales animales transgénicos que son capaces de expresar TCRs heterólogos se pueden immortalizar para proporcionar una fuente de un TCR específico para un antígeno particular. Las células T se pueden seleccionar en busca de especificidad para reaccionar con un antígeno particular y/o complejo de péptido-MHC. Las células de hibridoma que derivan de tales células T pueden servir como fuente para tal TCR heterólogo.

35 Las células T y/o las células de hibridoma derivadas también pueden servir como una fuente de ARNm para la preparación de librerías de ADNc a partir de las cuales se pueden clonar loci que codifican cadenas alfa y beta para los TCRs heterólogos. Tales genes de TCR clonados se pueden expresar en células de mamífero recombinantes para producir TCRs heterodiméricos. Los genes de TCR clonados también se pueden manipular genéticamente para proporcionar la expresión en células de mamíferos recombinantes de TCRs solubles monocatenarios.

40 La producción de líneas celulares immortalizadas se puede lograr fusionando una célula T seleccionada de interés con una línea celular immortalizante, por ejemplo una línea celular de mieloma.

Los TCRs heterólogos y los complejos de TCR que pueden incluir o no CD4 o CD8 quiméricos se pueden purificar o purificar parcialmente, o no. Adicionalmente, los TCRs heterólogos pueden ser específicos para un complejo particular de antígeno-MHC o péptido-MHC.

45 Para inducir una respuesta inmunitaria en el animal no humano transgénico mencionado anteriormente para inducir TCRs heterólogos de diversas especificidades, un método preferido incluye aquel en el que se inicia una respuesta mediada por células en un animal transgénico no humano administrando al animal una cantidad eficaz de un antígeno, ya sea un péptido o proteína de interés. Con estos inmunógenos es posible inducir que el animal inicie una respuesta estimulada por antígeno y produzca células T que expresan TCRs humanos específicos para ese antígeno. Tales células T se pueden identificar por métodos convencionales, y se pueden modificar si se desea y se pueden estudiar para determinar la capacidad para sufrir proliferación o cualquiera de los usos descritos anteriormente.

Breve descripción de los dibujos

55 La figura 1 es una ilustración en diagrama que muestra una vista general de las principales etapas de procedimiento usadas en la construcción de constructos sin el locus α del receptor de células T murino.

La figura 1 A es una ilustración esquemática que muestra el plásmido construido pPRtk, que comprende los sitios únicos *NdeI* y *BamHI*.

5 La figura 1 B es una ilustración esquemática que muestra las etapas generales para el aislamiento, amplificación e inserción de las secuencias de la cadena α de ratón de *BamHI* de 4,1 Kb, específica para el extremo 3' del locus $C\alpha$.

La figura 1 C es una ilustración esquemática del plásmido, pPURtk-C α 3', compuesto del extremo 3' de *BamHI* de 4,1 Kb del locus $C\alpha$.

10 La figura 1 D es una ilustración esquemática que muestra las etapas de procedimiento en la construcción del plásmido, pPURtk-C α 5'3', que está compuesto de un extremo 5' del fragmento de *NdeI* de 4,8 Kb del locus α insertado en el plásmido pPURtk-C α 3'.

La figura 1 E es una representación esquemática del plásmido pPUR usado en la construcción del vector seleccionador de dianas alfa, pPURtk-C α 5'3'.

La figura 1 F es una representación esquemática del locus d de TCR α (MUSTCRA), que muestra las posiciones de los exones 1-4 de $C\alpha$, con relación a los sitios de restricción de endonucleasas.

15 La figura 1 G es una representación esquemática de pPURtk-C α 3', que muestra el sitio de clonación del $C\alpha$ 3' de TCR α , con relación a los sitios de restricción presentes en el plásmido.

La figura 1 H es una representación esquemática de pPURtk-C α 5'3', que muestra los sitios de clonación del $C\alpha$ 5' y $C\alpha$ 3' de TCR α , con relación a los sitios de restricción presentes en el plásmido.

20 La figura 1 I es una representación esquemática del locus d de TCR α (MUSTCRA), que muestra las posiciones de restricción de endonucleasas a partir de las cuales se cortó la sonda A.

25 La figura 2 es una ilustración en diagrama que muestra una vista general de las etapas principales de procedimiento usadas en la construcción de los constructos sin el locus β del receptor de células T murino. El vector resultante es el plásmido pNEOtkC β 5'3'. En la vista general se indican detalles de otras figuras que se incorporan para mostrar cómo se lleva a cabo cada etapa en el procedimiento. Las etapas relevantes que se refieren a las figuras correspondientes se indican en las cajas, por ejemplo figura 2a y 2b.

La figura 2 A es una ilustración esquemática que muestra la región 3' del locus de TCR β en la que se generan sondas A y B a partir de ella.

La figura 2 B es una ilustración esquemática que muestra la región que comprende el locus de TCR β , 5' a C β 1.

30 La figura 2 C es una ilustración esquemática que muestra la región que comprende el locus β de TCR, 3' a C β 2.

La figura 2 D es una ilustración esquemática del vector, que muestra los sitios de restricción, usando para generar el plásmido pNEOtkC β 5'3'.

35 La figura 3 es una ilustración esquemática que representa el Cromosoma Artificial de Levadura 4 (pYAC4-Neo).

La figura 4 es una ilustración esquemática que muestra una vista general de las etapas llevadas a cabo para clonar el transgén del locus α del receptor de células T humano en el vector pYAC4-Neo, mod-pYAC4-neo.

La figura 4 A es una ilustración esquemática que muestra la localización cromosómica del locus alfa de TCR humano.

40 Las figuras 4 B-F son una ilustración esquemática que muestra el mapa de restricción del locus alfa de TCR humano.

La figura 5 es una ilustración esquemática que representa una vista general de las etapas usadas para construir el transgén del locus β del receptor de células T humano.

La figura 5 A es una ilustración esquemática de la localización cromosómica del locus beta de TCR humano.

45 Las figuras 5 B-E son una representación esquemática que muestra los resultados obtenidos a partir del cartografiado nucleotídico del locus beta de TCR humano.

La figura 5 F es una representación esquemática que muestra el gen de la cadena β de TCR superpuesto a la secuencia de YAC.

5 La figura 5 G es una representación esquemática del vector de TCR beta YAC humano que ilustra las regiones generales en las que se pueden insertar secuencias reguladoras y/o casetes de selección de mamífero.

La figura 6 es una representación esquemática que ilustra las etapas de reordenamiento de VDJ del TCR partiendo desde el gen V de línea germinal no reordenado hacia la secuencia de ADNc reordenada.

Descripción detallada de la invención

10 Se proporcionan animales no humanos transgénicos, como se resume anteriormente, que son capaces de producir un TCR humano con un repertorio de TCRs sustancial. A fin de que tales animales no humanos transgénicos produzcan una respuesta inmunitaria, es necesario que las células pre-T transgénicas expresen TCRs unidos a la superficie para efectuar el desarrollo de células T, producir células T maduras funcionales, y provocar una respuesta eficaz estimulada por antígeno. De este modo, la invención proporciona animales no humanos transgénicos que poseen transgenes de la cadena α y β de TCR heterólogo, en los que el animal no humano transgénico es capaz de producir TCR humano. Tales transgenes y animales no humanos transgénicos producen TCRs que son necesarios para la maduración de las células T. Los animales no humanos transgénicos de la invención son capaces así de producir TCRs que son codificados por secuencias genéticas de TCR heterólogo, y que también se unen a antígenos específicos.

20 A menudo es deseable producir TCRs humanos que son reactivos con antígenos humanos específicos que son dianas terapéuticas y/o de diagnóstico prometedoras. Sin embargo, la producción de TCRs humanos que se unen específicamente con antígenos humanos es problemática. El animal no humano inmunizado que sirve como la fuente de células T debe montar una respuesta inmunitaria eficaz frente al antígeno presentado. A fin de que un animal monte una respuesta inmunitaria, el antígeno presentado debe ser extraño, y el animal no debe ser tolerante al antígeno. De este modo, por ejemplo, si se desea producir TCR humano que se une a un péptido humano en el contexto de un receptor de HLA, la autotolerancia evitará que un ser humano inmunizado produzca una respuesta inmunitaria sustancial a la proteína humana, puesto que los únicos epítomos inmunógenos serán aquellos con polimorfismos de secuencia en la población humana. Se podría construir un animal no humano transgénico para esta aplicación que contenga un locus de TCR murino inactivado, y loci de TCR de cadenas alfa y beta humanos activos y loci humanos que codifiquen MHC, tales como el receptor HLA-A2 por ejemplo. La exposición de cada animal a un péptido o proteína antigénico generaría TCRs humanos capaces de reconocer el antígeno en el contexto de HLA humano.

35 Además, se sabe que la interacción del MHC clase I con TCR está potenciada por la presencia de un correceptor CD8; y para el MHC de clase II, la presencia de un correceptor CD4. Para ciertas aplicaciones, puede ser deseable tener loci humanos para el TCR, MHC y correceptor, para tener un sistema que imite la respuesta inmunitaria humana. Como alternativa, la interacción del TCR humano con el complejo de HLA humano-péptido en ausencia de una contribución de un correceptor humano puede dar como resultado un desplazamiento a favor de TCRs de mayor afinidad. Tales TCRs de afinidad elevada pueden no surgir en la situación endógena normal, y sería deseable como la base para compuestos terapéuticos. De este modo, para otras aplicaciones, puede ser deseable que sólo se expresen las moléculas de TCR y MHC codificadas por genes humanos, sin los genes correceptores CD humanos.

40 El uso de tal sistema de animal transgénico de TCR no humano es para imitar la generación de TCRs heterólogos en respuesta a la exposición por el antígeno, de manera que los TCRs producidos pueden reconocer e interactuar con el antígeno en el contexto de una molécula de HLA/MHC heterólogo. Se prevén variaciones de animales no humanos transgénicos de TCR. En los ejemplos proporcionados, el primero es un animal que se puede usar para producir TCRs completamente humanos de afinidad elevada, que reconocen péptido antigénico en el contexto de moléculas de HLA humanas. Animales no humanos transgénicos de TCR adicionales incluyen animales en los que algunos o todos los TCRs, moléculas correceptoras y/o moléculas de HLA son transgénicos. A fin de crear tales animales transgénicos, los loci endógenos pueden estar o no inactivados o eliminados. El transgén heterólogo se debe de introducir en el animal. La ventaja conferida inactivando los loci de TCR endógenos es que la inactivación elimina la posibilidad de una respuesta de TCR mixta, de manera que la única respuesta generada se basa en TCRs heterólogos. A fin de crear un animal no humano transgénico de TCR completamente modificado, también puede ser deseable inactivar las fuentes de TCR endógeno e incorporar transgenes de MHC/HLA, así como correceptores de CD4 y/o CD8, procedentes de la misma fuente heteróloga.

Como se usa aquí, un "transgén" es una secuencia de ADN introducida en la línea germinal de un animal no humano por medio de intervención humana, tal como por medio de los métodos descritos aquí.

55 Por la expresión "loci endógenos" se quiere incluir los loci genéticos naturales encontrados en el animal a transformar en el hospedante transgénico.

“Interrupción” o “inactivación” de los loci, como se usa aquí, puede incluir interrupción física del locus endógeno, o una interrupción funcional que da como resultado una incapacidad del locus para llevar a cabo la función requerida (es decir, la expresión de un gen o genes correctamente).

5 Como se usa aquí, la expresión “molécula heteróloga” se define en relación al organismo no humano transgénico que produce tales moléculas. Se define como una molécula que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ADN codificante que corresponde a aquella encontrada en un organismo que no consiste en el animal no humano transgénico.

10 En esta descripción preferida, un ratón transgénico se manipula mediante ingeniería para expresar las cadenas α y β del TCR humano. El ratón es capaz entonces de producir células T que poseen TCRs que reconocen específicamente antígenos peptídicos presentados en el contexto de una molécula del MHC. Este ratón transgénico puede generar numerosos TCRs humanos específicos de antígenos, que entonces se pueden seleccionar para el desarrollo de nuevos compuestos terapéuticos, y/o agentes de monitorización. También proporcionaría una herramienta de investigación básica para estudiar la regulación del sistema inmunitario.

15 Otra aplicación vislumbrada para tales animales no humanos transgénicos se desarrolló de un hospedante de tipo humano para evaluar la eficacia de terapias de inmunomodulación y/o vacunas. Además de la alteración del TCR, esto requeriría las siguientes modificaciones adicionales para lograr el hospedante completamente transgénico: supresión o inactivación de los loci murinos nativos de MHC I y/o MHC II; la introducción de loci de HLA humanos parciales o completos; la supresión o inactivación de los correceptores CD4 y/o CD8 murinos; la introducción de los correceptores CD4 y/o CD8 humanos o sus quimeras.

20 Para los fines de esta descripción, las moléculas heterólogas son de origen humano, y el hospedante animal no humano es ratón. Sin embargo, esta invención enseña cómo producir cualquier TCR heterólogo en cualquier animal no humano que se pueda manipular transgénicamente. Los animales no humanos preferidos adicionales pueden incluir, por ejemplo, rata, primate, chimpancé, cabra, cerdo, o pez cebra. Los TCRs heterólogos producidos pueden ser cualquier animal para el que se requiera el desarrollo de compuestos terapéuticos, vacunas, o el uso de TCRs.
25 Por ejemplo, las fuentes adicionales de moléculas heterólogas pueden incluir cualquier animal doméstico para el cual se desea el desarrollo de vacunación, tal como perro, gato, caballo, etc.

El enfoque básico para la producción de los animales no humanos transgénicos es inactivar o eliminar los loci genéticos del TCR de ratón e introducir en el ADN del ratón las secuencias de línea germinal de los loci de cadenas α y β del TCR humano. Las etapas mostradas en la Tabla 1 se pueden vislumbrar como una ruta para crear un animal transgénico deseado en el que, para los fines de ejemplo, el hospedante transgénico es murino y la fuente heteróloga para los transgenes es humana. El orden de las etapas mostrado en la Tabla 1 es con fines ejemplares solamente, y se pueden considerar órdenes alternativos a fin de alcanzar puntos finales deseados comparables. Con los loci endógenos suprimidos o inactivados y los loci heterólogos introducidos (en cualquier orden), el animal transgénico así creado se puede considerar un intermedio en la evolución hacia una creación de un ratón capaz de producir sólo TCR humano. También se debería señalar que algunos de los intermedios pueden ser valiosos para aplicaciones particulares, como se tratará más adelante. El animal transgénico con las sustituciones transgénicas humanas más amplias será útil para evaluar formulaciones de vacunas dirigidas al uso humano.

Los animales no humanos transgénicos, que tienen inactivados los loci endógenos y que poseen transgenes de TCRs heterólogos, se pueden producir a través de un número de etapas individuales. Cada etapa consiste en emparejamientos (o cruzamientos) de animales que tienen interrupciones y/o transgenes individuales. En esta estrategia, los animales individuales se producen a partir de embriones no humanos o de células ES no humanas que tienen un locus endógeno de interés interrumpido. Adicionalmente, en etapas separadas, los animales se producen a partir de embriones no humanos o células ES no humanas que poseen un único transgén de interés en su genoma. Un ratón individual que tiene mutaciones heterocigotas se cruza con un ratón que tiene la misma mutación heterocigota, a fin de generar ratones de progenie que son homocigotos para la mutación. Este procedimiento es seguido para cualquier mutación deseada.

La producción de los animales no humanos transgénicos deseados también se puede lograr a través de estrategias adicionales. Por ejemplo, el animal transgénico se puede producir a partir de un embrión no humano o una célula madre embrionaria (ES) no humana que tiene los loci genéticos endógenos deseados que tienen insertado en el genoma transgenes que comprenden los loci α y β de TCR humanos. Una vez que se produzca y se seleccione un embrión no humano o una célula ES no humana que contiene las alteraciones genéticas deseadas, se crea un animal transgénico no humano que tienen las mismas alteraciones genéticas mediante el uso del embrión no humano o células ES no humanas seleccionadas.

55 A fin de generar ratones que son homocigotos para dos interrupciones, se cruzan ratones progenitores que tienen mutaciones homocigotas de una interrupción con ratones homocigotos para una interrupción deseada. A fin de generar ratones que poseen más de un transgén de interés, se cruzan ratones progenitores que tienen un transgén contenido en sus genomas, y se selecciona la progenie, que contiene ambos transgenes. Finalmente, una vez que se han creado ratones que son homocigotos para las mutaciones deseadas, y se han creado ratones que poseen los transgenes deseados, se cruzan los ratones progenitores de cada genotipo y se selecciona la progenie, que son

homocigotos para todas las mutaciones y también contienen los transgenes deseados. Reproduciendo animales no humanos transgénicos intermedios apropiados (como se muestra en las etapas 1b, 4 y 5 de la Tabla 1), se pueden obtener transgénicos con sustituciones más amplias. Nuevamente, se debería observar que no es necesario llevar a cabo las etapas descritas aquí en el orden mencionado anteriormente, sino que se pueden reordenar a fin de crear ratones que tienen diversos genotipos intermedios.

En una realización preferida, los animales no humanos transgénicos de la invención se crearán mediante la incorporación de los transgenes en la línea germinal de embriones no humanos o células ES no humanas. Las células ES no humanas se pueden obtener a partir de embriones no humanos previos a la implantación cultivados *in vitro* (Evans, M. J., et al. (1981) Nature 292:154-156; Bradley, M. O., et al. (1984) Nature 309: 255-258; Gossler, et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 9065-9069; y Robertson, et al. (1986) Nature 322: 445-448). Los transgenes se pueden introducir eficientemente en células ES no humanas mediante un número de medios que incluyen transfección de ADN, microinyección, fusión de protoplasto, transducción mediada retrovéricamente, o fusión de micelas. Las células ES no humanas transformadas resultantes se introducirán entonces en un embrión no humano, y darán como resultado la contribución de ADN transgénico a la línea germinal del animal (para un repaso, véase Jaenisch, R. (1988) Science 240: 1468-1474).

TABLA 1

1a.

mu TCR supresión mu TCR- transgén inserto muTCR- huTCR⁺

1b.

muTCR- huTCR⁺ X huHLA-A2.1 → huTCR⁺ huHLA-A2⁺

2.

mu MHC supresión mu MHC⁻ transgén inserto muMHC⁻ huHLA⁺

(Para este ejemplo, el MHC/HLA) puede ser Clase I o Clase II, o ambos)

3.

mu CD supresión mu CD⁻ transgén inserto muCD⁻ huCD⁺

(Para este ejemplo, el correceptor CD puede ser CD4 o CD8 o ambos)

4.

muTCR-huTCR⁺ X muMHC- huHLA⁺ → muTCR- huTCR⁺/muMHC⁻ muHLA⁺

5.

huTCR⁺/huHLA⁺ X muCD- huCD⁺ → muCD-huCD⁺/huTCR⁺/huHLA⁺

Un método alternativo de creación de animales no humanos transgénicos incluye el uso de infección retroviral para introducir transgén o transgenes directamente en un animal no humano (Jaenich, R. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. 73: 1260-1264). El embrión no humano en desarrollo se cultiva hasta la etapa de blastocito, cuando se puede obtener la infección eficiente mediante tratamiento enzimático. Como alternativa, se puede inyectar virus o células productoras de virus en embriones no humanos de etapa tardía (Hogan, et al. (1986) en Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

La transferencia de transgenes a animales no humanos también puede incluir la microinyección de ADN en los cigotos. En la mayoría de los casos, el ADN inyectado se incorporará en el genoma hospedante antes de que comience a producirse el desarrollo. En consecuencia, el animal resultante poseerá el transgén incorporado en el genoma de todas las células somáticas del animal (Brinster, et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 4438-4442).

En una realización preferida, la inactivación de los loci endógenos se logra mediante interrupción seleccionada como diana de los loci apropiados a través de recombinación homóloga en células madre embrionarias no humanas. La incorporación de las células madre embrionarias no humanas modificadas que contienen una interrupción genética en el genoma del organismo resultante da como resultado la generación de animales no humanos que son capaces de transmitir las modificaciones genéticas a través de la línea germinal, generando de ese modo animales transgénicos que tienen loci genéticos inactivados.

Para inactivar los loci de TCR del hospedante mediante recombinación homóloga, se introduce ADN en una célula mediante transformación y se recombina en los loci endógenos para inhibir la producción de las subunidades de TCR endógenas. El término "transformación" pretende significar cualquier técnica para introducir ADN en una célula viable, tal como conjugación, transformación, transfección, transducción, electroporación, microinyección, lipofección, etc. Generalmente, la recombinación homóloga se puede emplear para inactivar funcionalmente cada uno de los loci, mediante introducción del ADN homólogo en embriones humanos o en células madre embrionarias no humanas. La producción de animales no humanos que tienen loci inactivados resulta entonces de la introducción de las células modificadas en blastocitos receptores. La reproducción subsiguiente permite la transmisión de la línea germinal del locus inactivado. Después se puede reproducir la descendencia heterocigota resultante y a continuación se puede seleccionar la progenie homocigota de los progenitores heterocigotos. Como alternativa, se puede usar la célula madre embrionaria no humana transformada para rutas adicionales de recombinación homóloga para generar inactivación de loci adicionalmente seleccionados como dianas, si se desea.

Los transgenes de la invención incluyen secuencias de ADN que son capaces de interrumpir alelos endógenos, y se pueden denominar aquí constructos o transgenes de "supresión", interrupción o inactivación. Además, tales transgenes son capaces de interrumpir física o funcionalmente alelos endógenos de manera que la incorporación de los transgenes de interrupción da como resultado la falta de expresión de los alelos endógenos. Tales transgenes comprenden secuencias de ADN homólogas a los loci seleccionados como dianas, y también incorporan un alelo de interrupción que codifica un TCR de cadena α o un TCR de cadena β interrumpido en un animal no humano transgénico.

Para la inactivación, se puede emplear cualquier lesión en el locus diana que dé como resultado la prevención de la expresión de una subunidad de TCR de ese locus. De este modo, la lesión puede estar en una región que comprende el potenciador, por ejemplo en dirección 5' o intrón, en las regiones V, J o C de los loci de TCR, y, con la cadena β , existe la oportunidad en la región D, o sus combinaciones. De este modo, el factor importante es que se inhibe el reordenamiento génico de la línea germinal de TCR, o no se puede producir un mensaje funcional que codifique la subunidad de TCR, ya sea debido a fallo de la transcripción, fallo del procesamiento del mensaje, o similar.

Preferiblemente, en el caso de células T, los alelos C β 1 y C β 2 de la cadena β de TCR, y lo más preferible el alelo C α para la cadena α de TCR, son seleccionados como diana para la inserción de un transgén que interrumpe la expresión del alelo. Por ejemplo, en el caso del alelo C α , una vez se identifica un genotipo que contiene un transgén que interrumpe la expresión de C α , se puede usar la reproducción cruzada para producir animales no humanos transgénicos homocigotos para el genotipo C α -negativo.

Estructuralmente, el transgén de supresión, en un aspecto de la invención, codifica una variante del polipéptido de TCR que comprende un TCR en el que se suprime toda o parte de la región constante. Preferiblemente, al menos se suprime parte de la región C. Sin embargo, las secuencias suprimidas también pueden incluir parte del segmento V, D y/o J del polipéptido de TCR. De este modo, se produce un constructo que carece de una región C funcional y puede carecer de las secuencias adyacentes, en dirección 5' y/o en dirección 3' de la región C, o comprende toda o parte de la región con una inserción inactivante en la región C. La supresión puede ser 50 pb o más, en el que tal supresión da como resultado la interrupción de la formación de un ARNm funcional. De forma deseable, la región C se suprime completamente o en parte sustancial, habitualmente al menos alrededor de 75% del locus, preferiblemente al menos alrededor de 90% del locus.

Para facilitar la indicación de la incorporación del transgén, se usa un gen marcador para sustituir la región C. Se pueden emplear diversos marcadores, particularmente aquellos que permiten la selección positiva. Es de particular interés el uso de resistencia a G418, que resulta de la expresión del gen para neomicina fosfotransferasa.

En dirección 5' y/o en dirección 3' desde el constructo génico diana puede haber un gen que proporciona la identificación de la aparición de un suceso de entrecruzamiento doble. Para este fin, se puede emplear el gen de timidina cinasa del virus del *Herpes simplex* (HSV-tk), puesto que las células que expresan el gen de timidina cinasa pueden ser exterminadas mediante el uso de análogos nucleosídicos tales como aciclovir o ganciclovir, o mediante sus efectos citotóxicos sobre células que contienen un gen de HSC-tk funcional. La ausencia de sensibilidad a estos análogos nucleosídicos indica la ausencia del gen de HSV-tk, y, por lo tanto, cuando se ha producido la recombinación homóloga, que también se ha producido un entrecruzamiento doble.

Después de la transformación o transfección de las células diana, las células diana se pueden seleccionar por medio de marcadores positivos y/o negativos, como se indicó previamente, resistencia a G418 y resistencia a aciclovir o ganciclovir. Aunque la presencia del gen marcador de G418 en el genoma indicará que se ha producido la integración, todavía será necesario determinar si se ha producido la integración homóloga. Aquellas células que muestren el genotipo deseado se pueden analizar entonces adicionalmente, lo que se puede lograr de muchas maneras, incluyendo análisis de restricción, electroforesis, análisis Southern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o similar. Identificando fragmentos que muestran la presencia de la alteración o alteraciones genéticas en el locus diana, se pueden identificar células en las que se ha producido la recombinación homóloga para inactivar una copia del locus diana. La mayoría de las veces, se empleará el análisis de ADN para establecer la localización de la integración.

Preferiblemente, se puede usar la PCR con ventaja en la detección de la presencia de recombinación homóloga. Se pueden usar sondas que son complementarias a una secuencia en el constructo y complementarias a una secuencia fuera del constructo y en el locus diana. De esta manera, se pueden obtener solamente cadenas de ADN que tienen ambos cebadores presentes en las cadenas complementarias si se ha producido la recombinación homóloga. Demostrando la presencia de las sondas para la secuencia de tamaño esperado, se demuestra la aparición de recombinación homóloga.

Generalmente, un cebador oligonucleotídico de ADN para uso en los métodos de PCR tendrá una longitud entre aproximadamente 12 y 50 nucleótidos, preferiblemente una longitud aproximadamente de 20-25 nucleótidos. Los cebadores oligonucleotídicos de la PCR pueden incluir adecuadamente sitios de restricción para añadir sitios de escisión de enzimas de restricción específicos al producto de PCR según se necesite, por ejemplo para introducir un sitio de ligamiento. En los Ejemplos y Dibujos a continuación se proporcionan cebadores ejemplares. Los productos de la PCR introducidos incluirán secuencias de las cadenas α y β de TCR amplificadas, y se pueden modificar para incluir, según se desee, secuencias de unión al ribosoma, secuencias intrónicas, secuencias líder y secuencias promotoras para el análisis óptimo del locus seleccionado como diana.

A la hora de construir los constructos objeto para la recombinación homóloga, se puede incluir un vector de ADN para procariontes, particularmente *E. coli*, para preparar el constructo, clonando después de cada manipulación, llevando a cabo el análisis, tal como el cartografiado o secuenciación de restricción, expandiendo y aislando las secuencias deseadas. El término "vector", como se usa aquí, significa cualquier secuencia de ácido nucleico de interés capaz de ser incorporada en una célula hospedante que da como resultado la expresión de un segmento de ácido nucleico de interés tal como aquellos segmentos o secuencias descritos anteriormente.

Los vectores pueden incluir, por ejemplo, segmentos o secuencias de ácidos nucleicos lineales, plásmidos, cósmidos, fagómidos y ADN extracromosómicos. Específicamente, el vector puede ser ADN recombinante. Cuando el constructo es grande, generalmente que supera alrededor de 50 kpb, habitualmente que supera 100 kpb, y habitualmente no más de alrededor de 1000 kpb, se puede usar un cromosoma artificial de levadura (YAC) para clonar el constructo.

Como se menciona previamente, el proceso de inactivación de los loci endógenos se puede llevar a cabo en primer lugar con el locus de la cadena α en células madre embrionarias no humanas que entonces se pueden usar para reconstituir blastocitos y generar animales no humanos transgénicos. La reproducción cruzada continua de estos animales puede dar como resultado la formación de animales homocigotos que se pueden usar como una fuente de células madre embrionarias no humanas. Estas células madre embrionarias no humanas se pueden aislar y transformar para inactivar el locus β , y el proceso se puede repetir hasta que se han inactivado todos los loci deseados. Como alternativa, el locus de la cadena β puede ser el primero.

Además de los métodos de inactivación de loci endógenos descritos aquí, existen métodos de inactivación preferidos, y pueden incluir, por ejemplo, el uso del sistema de transcripción *tet* para utilizar el control temporal de genes específicos de interés (Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:9302-9306) o la introducción de controles reguladores transcripcionales de desoxiciclina para el control específico de tejidos (Proc. Natl. Acad. Sci. (1996) 93:10933-10938).

Un método adicionalmente preferido para la inactivación funcional incluye el empleo de la supresión *cre-lox*, sistema de recombinación específica del sitio para la inactivación seleccionada como diana de loci genéticos, en el que se insertan sitios *loxP* en genes de flaqueo de interés y *cre* recombinasa activada para suprimir genes (Curr. Opin. Biotechnol. (1994) 5:521-527).

Como alternativa, se pueden utilizar métodos antisentido a fin de inhibir la transcripción de los loci deseados, dando como resultado así la interrupción funcional de los loci endógenos. En tal situación, se generarán oligonucleótidos antisentido que seleccionan como dianas secuencias específicas del locus designado de interés, tal como el locus TCR α o TCR β , en el que la selección antisentido exitosa de la diana da como resultado la producción inhibida de la proteína funcional.

La inactivación de los loci endógenos también se podría crear cruzando dos razas de ratones homocigotos comercialmente disponibles (The Jackson Laboratory, Maine). La primera raza, B6.129P2-*Tcr*^{btm1Mom}, contiene una supresión de los segmentos génicos D y C del locus TCR β , mientras que la segunda raza, B6.129S2-*Tcr*^{tm1Mom}, contiene una supresión del segmento génico C de TCR α [Momberts, et al. (1991) PNAS 88: 3084-3087; Momberts, et al. (1992) Nature 360: 225-231]. Ambas razas de animales no producen TCRs α/β funcionales, y, cuando se cruzan juntas, deberían producir un animal que tiene inactivados ambos loci de TCR endógenos.

Los transgenes preferidos adicionales de la invención incluyen secuencias de ADN que comprenden moléculas heterólogas. Los transgenes heterólogos preferidos de la invención incluyen subunidades de TCR heterólogas. Además, la incorporación de tales transgenes en el genoma del hospedante es capaz de conferir al hospedante la capacidad para expresar un repertorio de TCRs heterólogos. El término "expresión" o "expresión génica" usado aquí se refiere a la producción de producto proteico de la secuencia de ácido nucleico de interés que incluye la transcripción del ADN y la traducción de la transcripción del ARN.

Los genes que codifican los diversos segmentos y regiones que se pueden usar en la invención se han caracterizado muy bien. Los TCRs representan un porcentaje enorme de moléculas clonalmente variables con la misma estructura básica. El TCR es un heterodímero de 90 kd que consiste en dos polipéptidos transmembránicos de 45 kd cada uno conectados por puentes de disulfuro (Samuelson, et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 6972; Acuto, et al. (1983) Cell 34: 717; MacIntyre, et al. (1983) Cell 34: 737). Para la mayoría de las células T, los dos polipéptidos se denominan como la cadena α y β . Usando procedimientos de hibridación sustractiva, se han aislado clones de ADNc que codifican las cadenas polipeptídicas de TCR (Hendrick, et al. (1984) Nature 308: 149; Hendrick, et al. (1984) Nature 308: 153; Yanagi, et al. (1984) Nature 308: 145; Saito, et al. (1987) Nature 325: 125; Chien, et al. (1984) Nature 312: 314). El análisis de secuencias de estos clones de ADNc se emplea para revelar la secuencia primaria completa de los polipéptidos de TCR. Los polipéptidos de TCR son similares entre sí y se asemejan a la estructura de los polipéptidos inmunoglobulínicos. (Para un repaso, véanse Davis y Bjorkman (1988) *más arriba*; y Kronenberg, et al. (1986) Ann. Rev. Immunol. 4:529).

Al igual que las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas, las cadenas α y β tienen regiones V y C (Acuto, et al. (1983) *más arriba*; Kappler, et al. (1983) Cell 35: 295). La región V es responsable del reconocimiento antigénico, y la región C está implicada en el anclaje a la membrana y la transmisión de señales. La región V de las cadenas de TCR se subdivide además en los segmentos V y J. Además, la región variable de las cadenas β también contiene un segmento D interpuesto entre los segmentos V y J. La región constante de las cadenas de TCR está compuesta de cuatro regiones funcionales codificadas a menudo por diferentes exones (Davis y Bjorkman (1988) *más arriba*).

La disponibilidad de los ADNc de los TCRs permite un análisis de la organización genómica de los genes de TCR murinos y humanos. Los genes de TCR muestran una organización segmental similar a los genes inmunoglobulínicos. En el locus del gen de la cadena β , dos regiones C β casi idénticas están ordenadas en tándem, cada una precedida por un segmento D y seis segmentos J (Rowen, et al. (1996), Science 272:1755). El locus β también contiene aproximadamente 65 segmentos génicos V, 46 de los cuales parecen funcionales, uno de los cuales está situado en 3' con respecto a las regiones C en orientación opuesta (Rowen, et al. (1996) Science 272:1755). Durante el desarrollo somático de la célula T, se forma un gen de TCR funcional mediante reordenamiento de estos segmentos y regiones. Este proceso, representado en la FIG. 6, es la base de la diversidad de los receptores de células T.

Como se muestra esquemáticamente en las FIGS. 2 y 4, los segmentos codificantes para los genes de TCR están dispersos a lo largo de grandes conjuntos de ADN cromosómico. Los segmentos específicos V, D y J se fusionan para generar una región codificante V completa próxima a una región C. Las células B y T usan probablemente la misma maquinaria para el ensamblaje de Ig y TCR, puesto que las células B reordenan segmentos de TCR transfectados de la misma manera que los segmentos génicos de Ig transfectados, y los reordenamientos están mediados por secuencias similares que flanquean los segmentos a fusionar (Akira (1987) Science 238:1134; Yancopoulos, et al. (1986) *más arriba*). Los genes de la cadena β de TCR se reordenan y se transcriben en primer lugar, seguido del gen de la cadena α de TCR (Chien, et al. (1987) *más arriba*; Pardoll, et al. (1987) Nature 326: 79; Raulet, et al. (1985) Nature 312: 36; Samuelson, et al. (1985) Nature 315: 765; Snodgrass, et al. (1985) Nature 315: 232).

A fin de proporcionar la producción de TCRs humanos en un hospedante heterólogo, es necesario que el hospedante sea competente para proporcionar las enzimas necesarias y otros factores implicados en la producción de TCRs, a la vez que carezca de genes endógenos competentes para la expresión de los TCRs de las cadenas alfa y beta. De este modo, aquellas enzimas y otros factores asociados con el reordenamiento de la línea germinal, ajuste, y similar, deben ser funcionales en el hospedante heterólogo. Lo que faltará es una región natural funcional que comprenda los diversos exones asociados con la producción de cadenas de TCR endógeno, como se describe anteriormente.

De este modo, los loci de TCR de las secuencias de líneas germinales, o los genes α y β funcionalmente no reordenados procedentes de los loci de TCR humanos, son preferidos para obtener transgenes para uso en la presente invención. Tales secuencias heterólogas incluyen secuencias reguladoras así como secuencias de ADN estructurales que, cuando se procesan, codifican variantes polipeptídicas de TCR heterólogas capaces de representar el repertorio de TCRs. La única limitación en el uso de tales secuencias heterólogas es funcional. Las secuencias reguladoras heterólogas se deben de utilizar por el animal no humano transgénico para expresar eficientemente cantidades suficientes de los polipéptidos de TCR, de manera que sea capaz de producir un repertorio de TCRs. Además, los TCRs heterólogos, cuando se expresan apropiadamente en el animal transgénico, deben de ser capaces de producir la respuesta inmunitaria deseada. Todavía más, debería ser posible mezclar secuencias de ADN homólogas y heterólogas (por ejemplo, reguladores homólogos con genes estructurales heterólogos y viceversa) para producir transgenes funcionales que se pueden usar para la práctica de la invención.

Las estrategias de la presente invención se basan en la organización conocida de los loci de las cadenas α y β de los TCR. Los transgenes derivan, por ejemplo, de secuencias de ADN que codifican al menos una cadena polipeptídica de un TCR. Preferiblemente, como transgenes se usan secuencias de línea germinal del locus de la cadena α o β del TCR. Como se indicó, los loci de las cadenas α y β de los TCR se han caracterizado muy bien. Los transgenes de la presente invención derivan de tales secuencias de ADN.

Tal ADN se puede obtener a partir del genoma de células somáticas, y se puede clonar usando tecnología bien consolidada. Tales secuencias de ADN clonadas se pueden manipular adicionalmente después mediante técnicas recombinantes para construir los transgenes de la presente invención.

5 Tales transgenes heterólogos comprenden preferiblemente secuencias de ADN de línea germinal operablemente enlazadas del loci que se pueden expresar en un animal no humano transgénico. Como alternativa, para la preparación de transgenes, se pueden usar secuencias parcialmente reordenadas operablemente enlazadas o secuencias completamente reordenadas de las cadenas α o β de TCR.

10 Mediante la expresión "operablemente enlazadas" se quiere decir una secuencia genética enlazada operacionalmente (es decir, funcionalmente) a un segmento de ácido nucleico, o secuencias en dirección 5' (5') o en dirección 3' (3') de un segmento o secuencia dado. Esas secuencias cercanas a menudo impactan en el procesamiento y/o expresión del segmento o secuencia de ácido nucleico en un tipo celular deseado.

Típicamente, un segmento de ADN que codifica una proteína heteróloga de la invención se inserta en un vector, preferiblemente un vector de ADN, a fin de replicar el segmento de ADN en una célula hospedante adecuada.

15 A fin de aislar, clonar y transferir el locus de las cadenas α o β de TCR, se puede emplear un cromosoma artificial de levadura. Todo el locus se puede clonar y puede introducirse en uno o unos pocos clones de YAC. Si se emplean múltiples clones de YAC y contienen regiones de homología solapante, se pueden recombinar en cepas hospedantes de levadura para producir un único constructo que representa todo el locus. Los brazos de YAC se pueden modificar adicionalmente con casetes de selección de mamífero mediante retroajuste para ayudar en la introducción de los constructos en células madre embrionarias no humanas o en embriones humanos mediante los métodos explicados previamente.

20 A fin de obtener un amplio espectro de TCRs producidos, es preferible incluir toda o casi toda la secuencia de línea germinal de los loci de TCR. Sin embargo, en algunos casos, puede ser preferible que se incluya un subconjunto de toda la región V. Diversas familias génicas de la región V están interespaciadas en el racimo de regiones V. De este modo, obteniendo un subconjunto de los genes de la región V conocidos y de los loci de TCR de las cadenas α y β humanos (Berman et al., EMBO J. (1988) 7:727-738) en lugar de todo el complemento de las regiones V, se puede inmunizar al hospedante transgénico y puede ser posible montar una respuesta inmunitaria fuerte y proporcionar diversos TCRs.

30 Como se explica anteriormente, los transgenes humanos preparados de la invención se pueden introducir en los pronúcleos de oocitos o células madre embrionarias no humanas fertilizados. La integración genómica puede ser al azar u homóloga, dependiendo de la estrategia particular a emplear. De este modo, usando la transformación, que usa etapas repetitivas o en combinación con la reproducción, se pueden obtener animales no humanos transgénicos que son capaces de producir TCRs humanos en ausencia sustancial de subunidades de TCR del hospedante.

35 Una vez que los loci humanos se han introducido en el genoma del hospedante, ya sea mediante recombinación homóloga o mediante integración al azar, y los animales no humanos hospedantes se han producido con los loci de TCR endógenos inactivados mediante reproducción apropiada de los diversos animales transgénicos o mutados, se puede producir un hospedante que carece de la capacidad nativa para producir las subunidades de TCR endógenas, pero tiene la capacidad para producir TCR humano con un repertorio de TCRs sustancial.

40 Tal raza hospedante, con la inmunización con antígenos específicos, respondería mediante la producción de células T de ratón que producen TCRs humanos específicos. Entonces será posible aislar células T particulares que producen TCRs con especificidad preferida particular. Tales células T se podrían fusionar con células de mieloma de ratón, o se podrían immortalizar de cualquier otra manera para la producción estable y continua de TCRs humanos específicos.

Los TCRs humanos específicos de antígenos producidos mediante una línea celular inmortal como se describe se pueden aislar y usar para el desarrollo para uso terapéutico.

45 Adicionalmente, el aislamiento de ácidos nucleicos que codifican subunidades de TCR específicas de antígenos se puede realizar a partir de estas líneas celulares inmortales producidas. Los ácidos nucleicos aislados se pueden usar en la producción y desarrollo de compuestos terapéuticos a base de TCRs.

50 Los ácidos nucleicos aislados también pueden ser de interés en la preparación y producción de TCRs monocatenarios solubles, que se han descrito en las solicitudes de patentes U.S.S.N. 09/422.375, U.S.S.N. 08/943.086, y U.S.S.N. 08/813.781, en trámite junto con la presente, que se incorporan aquí como referencia.

55 La presente metodología y las estrategias de la presente invención no necesitan estar limitadas a producir animales no humanos transgénicos para producir TCRs heterólogos, sino también proporcionan la oportunidad para proporcionar la producción de componentes sistemas inmunitarios heterólogos adicionales. Por ejemplo, se sabe que los TCRs funcionan en el contexto de y mediante interacción con moléculas adicionales tales como las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), así como moléculas correceptoras CD4/CD8.

Los loci de MHC se han caracterizado muy bien. Los transgenes que codifican moléculas del MHC se pueden preparar de forma similar a los métodos descritos para los loci de TCR. Los transgenes de MHC se pueden incorporar entonces adicionalmente en células y en animales no humanos transgénicos producidos que coexpresan TCRs heterólogos conjuntamente con moléculas del MHC. Los transgenes de MHC heterólogos preferibles comprenden secuencias de ADN reordenadas, operablemente enlazadas, en las que la incorporación en el hospedante transgénico confiere a los animales no humanos la capacidad de expresar moléculas heterólogas del MHC I y/o MHC II.

Adicionalmente, se han creado previamente moléculas correceptoras humanas CD4 y CD8 que son funcionales en ratones y que tienen la capacidad de interactuar con moléculas de MHC humanas expresadas en ratones (Fugger, et al. (1994) PNAS 91: 6151-6155; Medsen, et al. (1999) Nature Genetics 23: 343-347; Kieffer, et al. (1997) J. Immunol. 159:4907-4912). Los correceptores quiméricos murinos-humanos CD4 o CD8, en los que el dominio extracelular del correceptor es humano y los dominios transmembránicos e intracelulares son murinos, también se podrían usar cuando aspectos esenciales de la señalización en las células murinas necesitan usar tales correceptores quiméricos; pero para la mayoría de los usos, los correceptores humanos funcionan bien.

De este modo, otras realizaciones de la invención incluyen la incorporación de transgenes que comprenden moléculas correceptoras CD4 y CD8 en animales no humanos transgénicos producidos y descritos anteriormente. Tales moléculas son funcionales para la interacción con TCRs humanos en el hospedante de ratón. Los correceptores se pueden expresar en hospedantes transgénicos de TCR, ya sea conjuntamente con o sin moléculas de MHC heterólogas.

Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la presente invención.

Materiales y métodos

Los ratones transgénicos, embriones y células madre embrionarias derivan y se manipulan según Hogan, et al., "Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach, E. J. Robertson, ed., IRL Press, Washington, D.C., 1987; Zijlstra, et al. (1989) Nature 342:435-438; y Schwartzberg et al. (1989) Science 246:799-803, ()

Los procedimientos de clonación de ADN y las manipulaciones del YAC se llevan a cabo según J. Sambrook, et al. en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., y Genome Analysis: A Laboratory Manual, Volumen 3 (1999), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Los recursos adicionales tales como razas de ratones transgénicos o de tipo salvaje, librerías de fuentes de YAC humano y oligonucleótidos se adquieren de proveedores externos. Por ejemplo, se pueden obtener recursos de Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine), ResGen (Huntsville, Alabama), HGMP Resource Centre (Cambridge, United Kingdom), y Sigma Genosys (The Woodlands, Texas).

Las células de hibridoma y los anticuerpos se manipulan según "Antibodies: A Laboratory Manual", Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

Ejemplo 1

Inactivación del gen de la cadena α de TCR de ratón mediante recombinación homóloga

Este ejemplo describe la inactivación del locus de TCR α endógeno de ratón mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias (ES), seguido de la introducción del gen mutado en la línea germinal de ratón mediante inyección de células ES seleccionadas como dianas que poseen un alelo α inactivado en embriones de ratón tempranos (blastocitos).

La estrategia es suprimir la región constante de la cadena α ($C\alpha$) mediante recombinación homóloga con un vector que contiene secuencias de ADN homólogas al locus α de ratón en el que se suprime un segmento de 3,7 kb del locus, que abarca los segmentos $C\alpha$, y se sustituye por el marcador seleccionable de puromicina *pur*.

Construcción del vector de selección de diana α :

El plásmido pPur (Clonetech; Palo Alto, CA) contiene el gen de resistencia a puromicina (*pur*), usado para la selección mediante fármacos de células ES transfectadas, bajo el control transcripcional del promotor SV40. El plásmido también incluye un sitio de poliadenilación de SV40 para el gen *pur*. Este plásmido se usa como el punto de partida para la construcción del vector de selección de diana de α . La primera etapa es insertar secuencias que codifican el gen de timidina cinasa.

El gen de timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV-tk) se incluye en el constructo a fin de permitir el enriquecimiento de los clones de ES que poseen recombinantes homólogos, como se describe por Mansour, et al (1988), Nature 336:348-352.

El casete de HSV-tk se obtiene a partir del plásmido pHSV-106 (GibcoBRL), que contiene las secuencias estructurales para el gen de HSV-tk encorchetado por el promotor tk y las secuencias de poliadenilación. El casete tk se amplifica a partir de pHSV-106 mediante PCR usando cebadores que cubren el sitio de *Bam*HI (TKf, véase más abajo) y un sitio situado próximo al sitio de poliadenilación y que codifica un sitio *Not*I (TKr, véase más abajo). El fragmento resultante se liga en pGEM T-Easy, se secuencian y se corta con *Bam*HI y *Not*I. El vector pPUR se modifica para incluir un sitio único *Not*I cortando con *Eco*RI y ligando en el oligonucleótido, AATTGCGGCCGC. El plásmido resultante, pPURtk, contiene sitios únicos *Nde*I, *Not*I y *Bam*HI (FIG. 1a).

TKf: ACTG GGATCCAAAT GAGTCTTCGG

TKr: ACTG GCGGCCGC CAAACGACCC AACACCCGTG

Las secuencias de la cadena α de ratón (FIG. 1b) se aíslan de una librería fágica genómica derivada de ADN hepático usando sondas oligonucleotídicas específicas para el locus $C\alpha$:

5'-CC CACCTGGATC TCCAGATTT GTGAGGAAGG TTGCTGGAGA GC-3' (MUSTCRA 89394-39437, exón 4 de $C\alpha$)

y para la región 5' respecto al exón 1 de $C\alpha$:

5'-GGAAA GCCCTGCTGG CTCCAAGATGGCTGAGGGAA AGGTCTACGG-3' (MUSTCRA 81681-81725, 5' respecto al exón 1 de $C\alpha$)

Un fragmento *Bam*HI de 4,1 kb que se extiende 3' del segmento $C\alpha$ de ratón se aísla de un clon fágico positivo mediante amplificación con PCR con los cebadores oligonucleotídicos PCa3'f y PCa3'r (secuencia proporcionada a continuación), y se subclona en pPURtk digerido con *Bam*HI para generar el plásmido pPURtk-Ca3' (FIG. 1c).

PCa3'f: 5'-TAGTGGATCC CATGCAGAGAGAAACCGAAGTACGTG-3'

PCa3'r: 5'-GCTACAGAGTGAAGTCATGGATCCT'G-3'

Un fragmento *Nde*I de 4,8 kb que se extiende 5' de la región $C\alpha$ también se aísla de un clon fágico positivo mediante amplificación por PCR con cebadores oligonucleotídicos PCa5'f y PCa5'r. El fragmento resultante se digiere con *Nde*I y se liga en pPURtk-Ca3' digerido con *Nde*I, en la misma orientación 5' a 3' que el gen *pur* y las secuencias de $C\alpha$ en dirección 3', para generar pPURtk-Ca5'3' (FIG. 1d).

PCa5'f: 5'-GGTCT GTGTTCCATA TGACGTCAGT ACG-3'

PCa5'r: 5'-ATTACATATG GGTCCCTAACTTAGGTCAGAACTCAGATGC-3'

Esto da como resultado un plásmido con las regiones de flanqueo de la $C\alpha$ pero, cuando se integra, da como resultado una supresión de $C\alpha$, haciendo de este modo al locus inactivo.

Generación y análisis de células ES no humanas con inactivación seleccionada como diana de un alelo $C\alpha$: Las células ES no humanas usadas son la línea AB-1 que se hace crecer en capas alimentadoras de células SNL76/7 mitóticamente inactivas (McMahon y Bradley (1990), Cell 62:1073-1085) esencialmente como se describe (Robertson, E. J. (1987) en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. E. J. Robertson, ed. (Oxford: IRL Press), p. 71-112).

Otras líneas ES no humanas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, la línea E14 (Hooper, et al. (1987) Nature 326:292-295), la línea D3 (Doetschman, et al. (1985) J. Embryol. Exp. Morph. 87:27-45), y la línea CCE (Robertson, et al. (1986) Nature 323:445-448). El éxito de la generación de una línea de ratón a partir de células ES que poseen una mutación específica seleccionada como diana depende de la pluripotencia de las células ES (es decir, su capacidad, una vez inyectadas en un blastocito hospedante, para participar en la embriogénesis y contribuir a las células germinales del animal resultante).

La pluripotencia de cualquier línea celular ES dada puede variar con el tiempo en el cultivo y con el cuidado con el que se ha manipulado. El único ensayo definitivo para la pluripotencia es determinar si la población específica de células ES no humanas a usar para la selección de dianas puede dar lugar a quimeras capaces de la transmisión de línea germinal del genoma de ES. Por esta razón, antes de la selección de dianas génicas, se inyecta una porción de la población progenitora de células AB-1 en blastocitos C57BL/6J para averiguar si las células son capaces de generar ratones quiméricos con contribución amplia de las células ES, y si la mayoría de estas quimeras pueden transmitir el genoma de ES a la prole.

El vector de inactivación de la cadena α pPURtk-Ca5'3' se digiere con *Not*I y se electropora en células AB-1 mediante los métodos descritos (Hasty, et al. (1991), Nature, 350:243-246). Las células electroporadas se siembran en placas de 100 mm a una densidad de $1-2 \times 10^6$ células/placa. Después de 24 horas, se añaden al medio G418 (200 μ g/ml de componente activo – para seleccionar células resistentes a neomicina) y flialuridina (1-(2-desoxi-2-

fluoro-(beta)-d-arabinofuranosil)-5-yodouracilo, o FIAU) (0,5 mM – para seleccionar células positivas a HSV-tk), y se deja que los clones resistentes a los fármacos se desarrollen durante 10-11 días. Los clones se recogen, se tripsinizan, se dividen en dos porciones, se expanden adicionalmente. La mitad de las células derivadas de cada clon se congelan entonces, y la otra mitad se analiza en busca de la recombinación homóloga entre el vector y las secuencias diana.

El análisis del ADN se lleva a cabo mediante hibridación de transferencia Southern. El ADN se aísla de los clones como se describió (Laird, et al. (1991), Nucl. Acids Res. 19:4293), se digirió con *Bam*HI y se sondó con el fragmento *Hind*III de 730 pb indicado en la Fig. 1d como sonda A. Esta sonda detecta un fragmento de *Bam*HI de 8,9 kb en el locus de tipo salvaje, y una banda de 2,4 kb de diagnóstico en un locus que se ha recombinado de forma homóloga con el vector seleccionador de diana (véase la FIG. 1d y 1e). Los clones positivos resistentes a puromicina y a FIAU se identificaron mediante análisis de transferencia Southern, que presentó la banda de *Bam*HI de 2,4 kb indicativa de una recombinación homóloga en uno de los genes *C α* digeridos con las enzimas de restricción *A*fII para verificar que el vector se integró de forma homóloga en uno de los genes *C α* . La sonda detecta un fragmento de 12,3 kb en el locus de tipo salvaje y un fragmento de 9,9 kb en el locus que se ha recombinado de forma homóloga.

Generación de ratones que poseen la cadena α de TCR inactivada:

Cinco de los clones de ES no humanos seleccionados como dianas descritos en la sección previa se descongelaron y se inyectaron en blastocitos C57BL/6J como se describió (Bradley, A. (1987) en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. E. J. Robertson, ed. (Oxford: IRL Press), p. 113-151), y se transfirieron a los úteros de hembras pseudopreñadas para generar ratones quiméricos que resultan de una mezcla de células derivadas de las células ES de entrada y el blastocito hospedante. El grado de contribución de las células ES a las quimeras se puede estimar visualmente mediante la cantidad de coloración del pelaje de agutí, derivado de la línea celular Es, en el antecedente de C57BL/6J negro. Se espera que aproximadamente la mitad de la descendencia que resulta de la inyección en blastocitos de los clones seleccionados como dianas sea quimérica (es decir, mostró pigmentación agutí así como negra), y, de éstos, la mayoría debería mostrar una amplia contribución de células ES (70 por ciento o mayor) a la pigmentación del pelaje. Las células ES AB1 son una línea celular XY, y una mayoría de estas quimeras de porcentaje elevado son machos debido a la conversión de sexo de embriones hembra colonizados por células ES masculinas. Las quimeras macho derivadas de 4 de los 5 clones seleccionados como diana se reproducen con hembras C57BL/6J, y la descendencia se monitoriza en busca de la presencia del color de pelaje agutí dominante indicativo de la transmisión de línea germinal del genoma de ES. Las quimeras procedentes de algunos de estos clones deberían generar habitualmente descendencia agutí. Puesto que se selecciona como diana una única copia del locus *C α* en los clones de ES inyectados, cada cría agutí tuvo una posibilidad del 50 por ciento de heredar el locus mutado. La identificación del gen seleccionado como diana se lleva a cabo mediante análisis de transferencia Southern de ADN digerido con *Bam*HI procedente de biopsias de la punta de la cola, usando la sonda utilizada para identificar clones de ES seleccionados como dianas (sonda A, FIG. 1d).

Aproximadamente el 50% de la descendencia agutí debería mostrar una banda de *Bam*HI hibridante de 2,4 kb además de la banda de tipo salvaje de 8,9 kb, demostrando la transmisión de línea germinal del locus *C α* seleccionado como diana. A fin de generar ratones homocigotos para la mutación, se reproducen juntos heterocigotos y se determina el genotipo *C α* de la descendencia, como se describe anteriormente.

Estos genotipos pueden derivar de emparejamientos heterocigotos: (i) ratones de tipo salvaje que poseen dos copias de un locus *C α* normal, (ii) heterocigotos que poseen una copia seleccionada como diana del gen *C α* y un gen *C α* murino normal, y (iii) ratones homocigotos para la mutación *C α* . La supresión de las secuencias de *C α* de estos últimos ratones se verifica mediante hibridación de las transferencias Southern con una sonda específica para el exón 2 de *C α* . Mientras que la hibridación de la sonda del exón 2 de *C α* se observa en muestras de ADN procedentes de hermanos heterocigotos y de tipo salvaje, no hay ninguna señal hibridante en los homocigotos, atestiguando la generación de una nueva raza de ratón en la que se han inactivado por supresión ambas copias del locus *C α* como resultado de la mutación seleccionada como diana.

Sonda del exón 2 de *C α* : 5'-CG TTCCCTGTGA TGCCACGTTG ACTGAGAAAA GCTTTG-3'

Ejemplo 2

Inactivación del gen de TCR β de ratón mediante recombinación homóloga

Este ejemplo describe la inactivación del locus de la cadena β de TCR murino endógeno mediante recombinación homóloga en células Es no humanas. La estrategia es suprimir los segmentos de la región constante de la cadena β (*C β*) endógena mediante recombinación homóloga con un vector que contiene secuencias de la cadena *C β* a partir de las que se han suprimido las regiones *C β* y se han sustituido por el gen para el marcador seleccionable por neomicina *neo*.

Construcción de un vector que selecciona como diana la cadena de *C β*

Los plásmidos pGT-N28 y pGT-N39 (New England Biolabs) contienen el gen de resistencia a neomicina (*neo*), usado para la selección mediante fármacos de células ES transfectadas, bajo el control transcripcional del promotor del gen de fosfoglicerato cinasa (*pgk*). El gen *neo* es seguido del sitio de poliadenilación de *pgk*. A fin de construir el vector de clonación para los constructos de la cadena C β , se cortan pNeo, pGT-N28 y pGT-N39 con *SpeI* y *AflII*, y el fragmento de 2,7 kb procedente de pGT-N28 se aísla y purifica y se liga al fragmento de 1,6 kb aislado y purificado a partir de la digestión de pGT-N39. El plásmido resultante, pNeo, contiene el gen *neo* flanqueado por los sitios de restricción únicos *NotI*, *EcoRI* y *HindIII*.

Las secuencias de la cadena C β de ratón que contiene las regiones 5' a C β 1 y 3' a C β 2 (FIG. 2a) se aíslan de una librería fágica genómica murina derivada de ADN hepático usando las siguientes sondas oligonucleotídicas específicas para la región constante de la cadena C β .

C β 1: 5'- TGAGAAAGTC CAAAACTCG GGGTACCATT CCACCATAGA-3' (AE000665 158041-158080)

C β 2: 5'-GGAGT TAACCTGGTT GTGTCTCAGC AGTTTCTTTG GACTCCTGTG-3' (AE000665 168427-168471)

Un fragmento de *BamHI/EcoRI* genómico de 3,0 kb, situado 5' con respecto de la región C β 1, se aísla a partir de un fago que se identifica usando la sonda C β 1. El fragmento clonado en el vector inactivado de C β se genera de la siguiente manera: el ADN fágico se digiere en primer lugar con *BamHI*, y un ligador de *BamHI/NotI* (véase B/N # 1 y # 2 más abajo) se hibrida y se liga antes de la digestión con *EcoRI*. Este fragmento se clona entonces en pNeo, que se ha digerido con *NotI* y *EcoRI*, dando como resultado un plásmido denominado pNeo Cb5'.

B/N #1 (parte superior): 5'-GAT CCG TTA ACG C-3'

B/N #2 (parte inferior): 3'-GC AAT TGC GCC GG-5

La siguiente etapa en la construcción implica la escisión de pPURtk (véase el ejemplo 1) del casete de timidina cinasa de HSV como un fragmento de *BamHI/NotI* y la ligación en pNeo Cb5' cortado con *BamHI* y *NotI*. El plásmido resultante posee el gen de HSV-tk, 3 kb de la secuencia 5' con respecto a la región C β 1, y el marcador seleccionable *neo* y se denomina pNEOtk Cb5'.

La etapa final en el proceso de construcción del vector inactivado de C β se logra aislando un fragmento de *HindIII* de 3,4 kb a partir de un fago positivo para la hibridación con la sonda C β 2. Este fragmento se clona en pNEOtk-C5' cortado con *HindIII*. El constructo resultante, pNEOtk-Cb5'3' (FIG. 2a y 2d), contiene 6,4 kb de secuencias genómicas que flanquean a los loci C β 1 y 2, con una supresión de 11,3 kb abarcando las regiones C β 1 y C β 2 en las que se ha insertado el gen *neo*.

Generación y análisis de células ES con inactivación seleccionada como diana de un alelo C β :

Células ES AB-1 (McMahon y Bradley (1990), Cell 62:1073-1085) se hacen crecer en capas alimentadoras de células SNL76/7 mitóticamente inactivas esencialmente como se describe (Robertson, E. J. (1987) Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. E. J. Robertson, ed. (Oxford: IRL Press), p. 71-112). Como se describe en el ejemplo anterior, antes de la electroporación de las células ES con el constructo pNEOtk-Cb5'3' seleccionador de dianas, se determina la pluripotencia de las células ES mediante generación de quimeras derivadas de AB-1 que se demuestra que son capaces de la transmisión de línea germinal del genoma de ES.

El vector pNEOtk-Cb5'3' de inactivación de la cadena C β se digiere con *NotI* y se electropora en células AB-1 mediante los métodos descritos (Hasty et al. (1991) Nature 350:243-246). Las células electroporadas se cultivan en placas de 100 mm a una densidad de 1-2 x 10⁶ células/placa. Después de 24 horas, se añaden al medio G418 (200 μ g/ml de componente activo) y FIAU (0,5 mM), y los clones resistentes a fármacos se dejan desarrollar durante 8-10 días. Los clones se recogen, se tripsinizan, se dividen en dos porciones, y se expanden adicionalmente. La mitad de las células derivadas de cada clon se congela entonces, y la otra mitad se analiza para determinar la recombinación homóloga entre el vector y las secuencias diana.

El análisis de ADN se llevó a cabo mediante hibridación de transferencia Southern. El ADN se aisló de los clones como se describió (Laird, et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4293), se digirió con *BamHI* y se sondó con el fragmento de PCR de 800 pb generado a partir de pNEOtk-Cb5'3' con los cebadores PRIMb5'f y PRIMb5'r como sondas A y B en la FIG. 2a. Esta sonda detecta un fragmento de *BamHI* de 10,4 kb en el locus de tipo salvaje, mientras que una banda de 7,4 kb es un diagnóstico de la recombinación homóloga de secuencias endógenas con el vector de selección de dianas. Los clones doblemente resistentes a G418 y FIAU, identificados mediante hibridación de transferencia Southern, y que se encontró que contenían el fragmento de 7,4 kb de diagnóstico de los sucesos esperados seleccionados como dianas en el locus C β , se confirmaron mediante digestión adicional con *HindIII*, *EcoRV* y *Tth1111*. La hibridación de las sondas A y B a las transferencias Southern de ADN digerido con *HindIII*, *EcoRV* y *Tth1111* produce bandas de 8,7 kb, 3,6 kb, y 3,4 + 3,9 kb, respectivamente, para el locus de tipo salvaje, mientras que se esperan bandas de 8,3 kb, 2,8 kb, y 0,9 + 3,4 kb, respectivamente, para el locus de cadena pesada seleccionado como diana.

PRIMb5'f: 5'-GGATTCA AAGGTTACCT TATGTGGCCA C-3'

PRIMb5'r: 5'-GCCCC AAAGGCCTAC CCGCTTCC -3'

Generación de ratones que poseen la supresión C β

5 Tres de los clones ES no humanos seleccionados como diana descritos en la sección previa se descongelaron y se
 inyectaron en blastocitos C57BL/6J como se describió (Bradley, A. (1987) en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem
 Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed., Oxford: IRL Press, p. 113-151), y se transfirieron en los úteros de
 hembras pseudopreñadas. El grado de la contribución de células ES a las quimeras se estimó visualmente a partir
 de la cantidad de coloración de pelaje de agutí, derivada de la línea de células ES, sobre el antecedente de
 10 C57BL/6J negro. La mitad de la descendencia que resulta de la inyección en blastocitos de dos de los clones
 seleccionados como dianas debería ser quimérica (es decir, mostrar pigmentación agutí así como negra). La
 mayoría de las quimeras debería mostrar una contribución de células ES significativa (aproximadamente 50 por
 ciento o mayor) a la pigmentación del pelaje. Puesto que las células ES AB1 son una estirpe celular XY, la mayoría
 de las quimeras son machos, debido a la conversión de sexo de embriones hembra colonizados por células ES
 15 masculinas. Las quimeras macho se reproducen con hembras C57BL/6J, y la descendencia se monitoriza en busca
 de la presencia del color de pelaje agutí dominante, indicativa de la transmisión de línea germinal del genoma de ES.
 Las quimeras procedentes de ambos clones deberían generar normalmente descendencia agutí. Puesto que sólo se
 selecciona como diana una copia del locus de cadena pesada en los clones de ES inyectados, cada cría agutí tuvo
 una probabilidad de 50 por ciento de heredar el locus mutado. La identificación del gen seleccionado como diana se
 20 lleva a cabo mediante análisis de transferencia Southern de ADN digerido con *Bam*HI procedente de biopsias de la
 cola, usando la sonda utilizada para identificar clones de ES seleccionados como dianas (sonda A, FIG. 2a).
 Aproximadamente el 50% de la descendencia agutí debería mostrar una banda de BamHI hibridante de
 aproximadamente 7,4 kb además de la banda de tipo salvaje de 10,4 kb, demostrando la transmisión de línea
 germinal del segmento de gen C β (C β KO) seleccionado como diana.

25 A fin de generar ratones homocigotos para el C β KO, se reproducen juntos heterocigotos, y el genotipo de la cadena
 β de la descendencia se determina como se describe anteriormente. A partir de los emparejamientos heterocigotos
 se derivan tres genotipos: ratones de tipo salvaje que poseen dos copias del locus C β normal, heterocigotos que
 poseen una copia seleccionada como diana del gen y una copia normal, y ratones homocigotos para la mutación
 C β KO. La ausencia de secuencias de C β de estos últimos ratones se verifica mediante análisis de transferencia
 30 Southern de una digestión con BamHI de clones positivos usando C β 1 o C β 2 como sondas. Estas sondas no
 deberían generar señal de ratones con el locus C β KO, mientras que aquellos con el locus de tipo salvaje deberían
 generar fragmentos de 10,4 y 6,2 kb respectivamente, atestiguando la generación de una nueva raza de ratón en la
 que ambas copias del gen de cadena pesada se han mutado por supresión de las secuencias de C β .

Ejemplo 3

Construcción del vector y modificación para clonar loci de TCR humanos

35 Vector pYAC4-neo:

La levadura es un excelente hospedante en el que clonar fragmentos grandes de ADN exógeno como cromosomas
 artificiales de levadura (YACs). Se han construido *in vitro* moléculas de ADN lineales de hasta 1,2 megapares de
 bases (Mpb) de longitud, se han transformado en células de levadura hospedantes, y se han propagado como
 40 réplicas fiables del ADN genómico fuente (Burke, D.T., Carle, G.F. y Olson, M.V. (1987) *Science* 236: 806;
 Bruggemann, M, y Neuberger, M.S. (1996) *Immunol. Today* 7:391). Uno de los vectores YAC más ampliamente
 usados ha sido pYAC4 (Burke, D.T., et al.; FIG. 3a). Este vector se puede transformar en *Escherichia coli* o en
 levadura, y se replicará como una molécula circular en cualquier hospedante. Sin embargo, pYAC4 se usa
 preferentemente para clonar grandes insertos como cromosomas de levadura lineales. El vector pYAC4 de primera
 45 generación se ha modificado para contener el gen de neomicina para facilitar la selección de transfectantes de pYAC
 que son resistentes a G418 (Cooke, H. y Cross, S. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16: 11317). Se modificará
 adicionalmente el vector pYAC4-neo añadiendo una región poliligadora que contiene los sitios de restricción
*Eco*RI, *Fse*I, *Ksp*I, *Asc*I, y *Eco*RI. El poliligador se clonará en el sitio de *Eco*RI del gen *SUP4-o*, un alelo supresor ocre de un
 gen tRNA^{Tyr}. Debido al corte infrecuente mediante estas endonucleasas de restricción, la digestión de ADN humano
 con ellas generará grandes fragmentos de ADN que incluyen gran parte de los loci alfa y beta de TCR.

50 Para añadir la secuencia del poliligador al vector pYAC4-neo, se aísla y se digiere con *Eco*RI, y después se liga en
 presencia de oligonucleótidos hibridados que codifican la secuencia del poliligador para producir mod-pYAC4-neo.
 Las secuencias oligonucleotídicas son las siguientes:

FseI
KspI
AscI

pYAC4 Oligo-(1) 5'-AATTCggCCggCCCCgCggggCgCgCCg-3'

pYAC4 Oligo-(2) 5'AATTCggCgCgCCCCgCggggCCggCCg-3'

El vector mod-pYAC4-neo se usa entonces para transformar células de *E. coli* para generar grandes cantidades del ADN vectorial para la clonación y manipulación de grandes fragmentos de ADN humano que tienen una longitud >500 kpb.

5 Ejemplo 4

Clonación del locus de TCR α humano en el vector mod-pYAC4-neo:

El ADN de peso molecular elevado se prepara a partir de leucocitos circulantes que se cosechan a partir de sangre completa mediante una modificación del método de Luzzatto (Luzzatto, L. (1960) Biochem. Biophys. Res. Commun. 2:402). El ADN se purifica mediante un procedimiento de gradiente por etapas de sacarosa desarrollado originalmente para el aislamiento de moléculas de ADN cromosómico intactas a partir de esferoplastos de levadura. Aunque este protocolo implica sólo una purificación de una etapa de un lisado bruto, produce muestras de ADN que están libres de nucleasas contaminantes y que son escindidas fácilmente por la mayoría de las endonucleasas de restricción. En *Methods in Enzymology* (1991) 194:251-270 se puede encontrar un protocolo detallado para aislar ADN humano de peso molecular elevado. El locus de TCR α humano está situado en el cromosoma 14q11.2, y se ha secuenciado en su totalidad y se ha depositado en la base de datos de nucleótidos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (FIG. 4a). El objetivo principal es crear un animal transgénico que exprese TCR humano que presente una diversidad de TCR amplia. Por lo tanto, se cree que sería mejor usar endonucleasas de restricción que corten de forma infrecuente para generar un fragmento de ADN grande pero manejable que incluiría la mayoría de, si no todos, los exones variables de TCR y todos los segmentos de unión. El acceso a la información de secuencias nucleotídicas, particularmente aquella de los loci de TCR α/β humanos, ha potenciado enormemente la capacidad para identificar enzimas de endonucleasas de restricción de corte único para digerir el ADN humano en fragmentos que codifican el locus de interés para la clonación en vectores YAC. Usando la base de datos de NCBI y el software Vector NTI, fue posible generar un mapa de restricción del locus de TCR α (véanse FIG. 4B-F). El análisis reveló que una enzima, *KspI*, digerirá el locus de TCR α humano en 72426 pb o 5' del primer exón variable (TCRAV1). También corta el ADN una segunda vez en dirección 3' del potenciador de 3' a 1.060.946 pb. El producto del fragmento de *KspI* tiene 988.520 pb o casi 1 megabase (Mpb) de longitud. Con esta información se fraccionará en tamaños el ADN y se aislarán fragmentos de ADN de aproximadamente 1 megabase para la clonación en el vector mod-pYAC4. De forma breve, la muestra digerida se fraccionará en tamaños y se purificará usando electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). Usando este protocolo deberíamos eliminar fragmentos digeridos con *KspI* contaminantes que son más pequeños de 1 Mpb de longitud. Esto incrementará la eficiencia de la clonación en el vector YAC, así como facilitará el aislamiento de un fragmento de ADN que contiene el locus de TCR α humano. Después de PFGE, el gel se teñirá con bromuro de etidio, y la banda de 1 Mpb se cortará y el ADN se aislará usando GELasa y precipitación con etanol (EpiCenter, Madison, WI). El ADN intacto, muy puro, que se recupera se clonará entonces en el vector mod-pYAC4-neo.

35 Mod-pYAC4-neo(α):

La generación del vector HuTCR α YAC se logra digiriendo el vector de clonación con BAmHI y con *KspI* para producir productos de brazo izquierdo y brazo derecho que entonces se desfosforilan. La función del tratamiento con fosfatasa es evitar la formación de fragmentos vectoriales concadenados que más tarde serían difíciles de separar de los productos de ligación deseados mediante fraccionamiento en tamaños. En términos más específicos, se mezclan 40-100 μ g de ADN de inserto con un peso igual de vector mod-pYAC4-neo preparado. Ajustese el volumen hasta 250 μ l y la composición de tampón con tampón de reacción de ligación de New England Biolabs (NEB), y después añádanse 1000 unidades de T4 ADN ligasa de NEB y permítase incubar la reacción de ligación a 15°C durante 10 horas.

Transformación:

45 El material ligado se usará entonces para transformar esferoplastos de levadura (Burgers, P.M.J. y Percival, K.J. (1987) Anal. Biochem. 163: 391-397). Se escogió la cepa de levadura AB1380 para un hospedante de transformación puesto que se ha usado ampliamente como hospedante para otros; sin embargo, también son adecuadas otras cepas hospedantes de levadura, tales como YPH925. Los transformantes se seleccionarán en un medio sintético que carece de uracilo; estas placas se preparan siguiendo recetas estándar. Estos transformantes se
50 identificarán para identificar positivos que poseen el vector HuTCR α YAC, también denominado mod-pYAC-neo(α).

Identificación de colonias:

El protocolo de identificación de colonias implica hacer crecer las colonias sobre la superficie de una membrana de nailon, convertir a la levadura en un esferoplasto, lisar los esferoplastos con detergente, y desnaturalizar el ADN con base. Se usará el protocolo descrito por Brownstein, et al. (Brownstein, B.H., Silverman, R.D., Little, R.D., Burke, D.T., Korsmeyer, S.J., Schlessinger, D., y Olson, M.V. (1989) Science 244: 1348). De forma breve, este protocolo usa la técnica de replicación en placa mediante transferencia de colonias para obtener filtros duplicados, uno que proporcionará colonias para el sondaje, y un duplicado que proporcionará células viables para la preparación de

clones positivos. Las colonias de levadura se hacen crecer hasta el tamaño apropiado para identificar colonias en el filtro de nailon. Esto requiere aproximadamente 2 días de crecimiento a 30°C. Uno de los filtros duplicados que contiene colonias se transfiere a un papel de filtro grueso saturado con 2 mg/ml de enzima lítica de levadura [ICN #152270, >70.000 unidades (U)/g], en 1,0 M de sorbitol, 0,1 M citrato de sodio, 50 mM de EDTA, y 15 mM de ditiotreitól (pH del tampón de enzima ajustado a 7), y se incubó toda la noche a 30°C. La membrana se transfiere a un papel de filtro saturado con dodecilsulfato de sodio al 10% durante 5 minutos a temperatura ambiente. La membrana se transfiere entonces a un filtro de papel saturado con 0,5 M de NaOH durante 10 minutos, y se neutraliza transfiriéndola a tres filtros de papel sucesivos saturados con 0,3 M de NaCl, 30 mM de citrato de sodio, 0,2 M de Tris HCl, pH 7,5 durante 5 minutos cada vez. Después de que los filtros se han secado al aire, se llevará a cabo el sondaje usando oligonucleótidos marcados y técnicas de hibridación y de autorradiografía estándar. Para identificar las colonias positivas para el locus de TCR α humano, se identificarán colonias usando dos sondas nucleotídicas específicas para los extremos 5' y 3' del inserto de ADN. Estos oligonucleótidos se recombinan a sitios de aproximadamente 100 pb en dirección 5' del sitio de *KspI* del extremo 5' y 100 pb en dirección 5' del sitio de *KspI* del extremo 3', respectivamente, y sus secuencias son las siguientes:

Oligo #1 de identificación – 5'- GTCTCTACTT TACTAAAAAT ACAAAAATTA GCCAGGTGTG GTGGTG-3'

Oligo #2 de identificación – GTCACAGGGC TGAGGGAAGG AGACAAGAGC CTGGACAGCA-3'

Locus de TCR α humano transgénico:

Después de ensamblar el locus transgénico de TCR α humano en mod-pYAC-neo(α), que puede contener todos los exones V α y J α , el exón C α individual, y el potenciador 3', se puede introducir el vector HuTCR α YAC en células madre embrionarias no humanas (ES) mediante fusión de esferoplastos con la cepa hospedante de levadura (Pachnis, V., Pevny, L., Rothstein, R., y Constantini, F. (1990) PNAS 87: 5109-5113; Huxley, C. y Gnirke, A., (1991) Bioessays, 13: 545-550; Davies, N.P y Huxley, C. (1996) en Methods in Molecular Biology, Vol. 54: YAC Protocols. Eds. D. Markie. Humana Press Inc., Tolowa, NJ.).

Se usará la resistencia a G418 para monitorizar células ES no humanas que se fusionan sucesivamente con la levadura que contiene el HuTCR α YAC. La selección de células ES no humanas positivas para HuTCR α YAC resistentes a neomicina se analizarán 2-3 semanas después de la fusión de esferoplastos. Tras la PCR y la identificación mediante análisis de transferencia Southern de las células ES apropiadamente modificadas, cinco clones se expandirán y se introducirán en blastocitos (Hogan, B.R, Beddington, F., Constantini, F. y Lacy, E. (1994) Manipulating the Mouse embryo: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. p. 477), y se implantarán en una raza hospedante de hembra pseudopreñada. La reproducción de ratones quiméricos con ratones que son MuTCR α negativos/MuTCR β negativos (véase el Ejemplo 10) debería dar como resultado ratones que producen sólo TCR α humano.

Ejemplo 5a

Clonación del locus de TCR β humano en el vector mod-pYAC-neo

El ADN humano para digestión y clonación se preparará como se describe en el Ejemplo anterior. El locus beta de TCR β humano está situado en el cromosoma 7q35, y se ha secuenciado en su totalidad y se ha depositado en la base de datos de nucleótidos de NCBI. Usando la base de datos de NCBI y el software Vector NTI, se ensambló el locus de TCR α humano y se llevó a cabo el cartografiado nucleotídico (véanse FIG. 5b-h). El análisis del ejercicio de cartografiado reveló que la digestión de ADN genómico humano con endonucleasas de restricción tanto *FseI* como *AsclI* generará un gran fragmento de ADN que contendría 21 de 30 exones variables, todos los segmentos de unión y de diversidad, ambos exones constantes y el potenciador de 3'. La longitud del fragmento de ADN de TCR β se determina que es 598.054 pb (véase la Figura 5b-h). Con esta información disponible, se podrá fraccionar en tamaños el ADN y aislar fragmentos de ADN en la longitud de 500-600 kpb para la clonación en el vector pYAC.

Tras aislar el ADN, se digerirán 100 μ g usando las dos endonucleasas de restricción específicas para generar un fragmento que contiene la mayoría del locus de TCR β humano. Como se describe en el Ejemplo 4, la muestra de ADN digerida se fraccionará en tamaños y se purificará usando PFGE. Esto incrementará la eficiencia de la clonación y la probabilidad de aislar un fragmento de ADN que contiene la mayoría del locus de TCR β humano. Después de llevar a cabo la PFGE hasta la terminación, la banda de 600 Kpb se cortará del gel, y el ADN se aislará usando GELasa (EpiCenter, Madison, WI) y precipitación con etanol. El ADN muy puro e intacto se recuperará y después se clonará en el vector mod-pYAC4-neo.

Mod-pYAC4-neo(β)

La preparación del vector Mod-pYAC4-neo(β) es similar al procedimiento usado para clonar el locus de TCR α humano, excepto que el ADN vectorial se digirió en primer lugar con *Bam*HI, y después con *FseI* y *AsclI*. La ligación del ADN de inserto en el vector pYAC es similar a la descrita para el locus de TCR α humano descrito en el Ejemplo 4. Después de la transformación de la levadura con el vector pYAC que contiene el locus de TCR β humano, se llevará a cabo la identificación de las colonias como se describe previamente.

Locus de TCR β humano transgénico:

Después de ensamblar el translocus de TCR β humano en Mod-pYAC4-neo(β), el constructo, HuTCR β YAC, que puede contener la mayoría de los segmentos V β y todos los segmentos J β y D β , los dos exones C β , y el potenciador de 3', se introducirá el HuTCR β YAC en células madre embrionarias no humanas (ES) mediante fusión de esferoplastos

(Pachnis, V., Pevny, L., Rothstein, R., y Constantini, F. (1990) PNAS 87: 5109-5113; Huxley, C. y Gnirke, A., (1991) Bioessays, 13: 545-550; Davies, N.P y Huxley, C. (1996) en Methods in Molecular Biology, Vol. 54: YAC Protocols. Eds. D. Markie. Humana Press Inc., Tolowa, NJ.), y se producirán ratones quiméricos mediante inyección de blastocitos (Hogan, B.R., Beddington, F., Costantini, F. y Lacy, E. (1994) Manipulating the Mouse embryo: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. p. 477).

La resistencia a G418 se usará para monitorizar células madre embrionarias HM-1 que se han fusionado con la levadura que contiene YAC. Entonces se analizará la selección de células ES HM-1 positivas a HuTCR β YAC resistentes a neomicina, 2-3 semanas después de la fusión. Las células ES que contienen una copia completa de HuTCR β YAC se confirmarán mediante hibridación Southern, y los clones positivos a HuTCR β YAC se usarán para reconstituir blastocitos para producir animales quiméricos. La reproducción de animales quiméricos con ratones C57BL/6J que son MuTCR α negativo/MuTCR β negativo (véase el Ejemplo 10) debería dar como resultado la transmisión de línea germinal y ratones que tienen el locus HuTCR β integrado en sus genomas. La transmisión génica se puede confirmar mediante análisis de transferencia Southern de ADN de cola.

Ejemplo 5b

También se pueden construir mediante métodos alternativos ratones que expresan el gen de TCR α o TCR β humano. Por ejemplo, es posible reconstruir el locus de cadena β de TCR con varios clones de YAC humanos usando la información obtenida a partir de las bases de datos de NCBI y de National Human Genome Research Institute. Estos YACs humanos identificados, están disponibles de ResGen, y contienen una secuencia de cadena β de TCR y homología solapante. El primer clon de YAC, D49H4, contiene el extremo 5' del locus de TCR β hasta las repeticiones del gen de tripsinógeno, mientras que el segundo YAC, 940 a 12, contiene el extremo 3' del locus de TCR β (Figura 5i). Puesto que los dos clones tienen regiones significativas de homología solapante, se pueden usar para ensamblar un único TCR β YAC humano (HuTCR β YAC) vía recombinación homóloga. El suceso de recombinación, así como la falta de supresiones aleatorias o quimerismo, se puede confirmar mediante PCR usando conjuntos de cebadores que flanquean las regiones de homología de secuencia entre los dos genes, PFGE y/o análisis de transferencia Southern.

Antes de la introducción del HuTCR β YAC en células de mamífero o en embriones no humanos, los brazos del constructo de YAC se pueden modificar. Los brazos del HuTCR β YAC se alteran para incluir secuencias reguladoras de ratón y/o casetes de selección de mamífero mediante una técnica denominada "retroajuste" (Figura 5j). Los brazos de YAC se retroajustan con vectores, tales como pRAN4 (Markie, D. et al., (1993) Somatic Cell and Molecular Genetics, 19: 161-169), mediante una variedad de métodos de transformación descritos por Eric D. Green en Genome Analysis: A Laboratory Manual, Volumen 3 (1999), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. La modificación de estos brazos debería ayudar a la selección de sucesos de fusión exitosos entre la cepa hospedante de levadura y las células ES no humanas, además de reforzar la expresión del transgén de HuTCR β una vez que se ha integrado en el genoma hospedante.

Después del ensamblaje y modificación del constructo de HuTCR β YAC, que puede contener la mayoría de los segmentos V β , todos los segmentos J β y D β , y los dos exones C β , el HuTCR β YAC se introduce en células ES no humanas mediante fusión de esferoplastos. Las células ES fusionadas con éxito se pueden usar para reconstituir blastocitos de ratón y generar quimeras. Como alternativa, el constructo se podría aislar a partir de la cepa hospedante de levadura y se podría introducir en embriones no humanos de etapa de una célula vía microinyección como se explica en Hogan, et al., "Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, con ligeras modificaciones para evitar el cizallamiento del constructo de HuTCR β YAC (Montolui, L. (1996) in Methods in Molecular Biology, Vol.54: YAC Protocols. Eds. D. Markie. Humana Press Inc., Tolowa, NJ.). La descendencia resultante se puede ensayar en busca de la integración del constructo HuTCR β YAC en el genoma del ratón mediante análisis Southern de biopsias de cola. Los animales identificados positivamente se pueden reproducir hasta homocigosidad y se pueden cruzar con otras razas de ratón existentes.

Ejemplo 6

Generación de ratones TCR α/β humano

A) Generación de un ratón TCR α/β humano a través de cruzamiento genético entre el ratón HuTCR α y el ratón HuTCR β :

Ambos ratones que contienen HuTCR α y HuTCR β se reproducirán en un antecedente de C57BL/6J. Estos ratones todavía tienen loci de TCR α/β murinos funcionales que presentan TCR murino sobre sus células T. La reproducción exitosa de estos ratones debería dar como resultado la generación de un ratón de transloci de C57BL/6J que contiene TCR humano y murino funcional. Para determinar si el ratón tiene los dos loci de TCR α/β humanos, se llevará a cabo una hibridación Southern usando ADN de la cola y sondando las membranas con oligonucleótido específico de alfa o beta.

B) Generación de un ratón positivo a TCR α/β humano en un antecedente sin TCR α/β murino:

Entonces se usarán ratones generados en A (que son positivos para ambos loci de TCR de ratón y humano) en la siguiente ronda de reproducción para poner los loci de TCR α/β humanos en un antecedente de C57BL/6J que tiene suprimidos o inactivados los loci de TCR murinos endógenos. Esto se llevará a cabo cruzando un ratón carente de TCR α/β murino con un ratón que es positivo tanto para el loci de TCR α/β murino como para el loci de TCR α/β humano. La identificación de ratones positivos se llevará a cabo nuevamente usando ADN tratado con endonucleasas a partir de cortes de la cola y junto con técnicas de hibridación Southern. Los fragmentos de ADN que se hicieron correr en un gel y que se transfirieron a una membrana de nailon se sondarán con cebadores específicos para la cadena α o β de TCR, respectivamente. Los ratones TCR α/β humano positivo y negativos para TCR α/β murinos se hicieron crecer hasta 8 semanas de edad y algunos se sacrificaron para aislar bazo para teñir las células T esplénicas. La identificación de células T que expresan TCRs α/β humanos se lleva a cabo usando inmunofluorescencia y citometría de flujo. El enfoque se basará en usar el mAb específico anti-TCR humano conjugado con ficoeritrina (TCR Pan α/β , clon BMA031 (ratón IgG2b) Coulter Immunotech, ME).

C) Generación de un ratón positivo a TCR α/β humano en un antecedente sin TCR α/β murino cruzado con un ratón C57BL/6J que contiene la molécula del MHC clase I humana HLA-A2:

Este es un ejemplo de un tipo de ratón que se generará para nuestras necesidades posteriores de crear TCR α/β humano que están restringidos por una molécula del MHC clase I humana. En este ejemplo, se escogió usar la molécula de clase I humana conocida como HLA-A2.1. Las células T generadas que son reactivas frente a péptidos restringidos por esta molécula de MHC son generalmente del fenotipo CD8⁺, y tienen naturaleza citolítica. El alelo de HLA-A2.1 se expresa próximo al 50% de la población, haciéndolo la forma más prevalente de MHC expresada. Para demostrar la reducción a la práctica, se escogió cruzar el ratón transgénico TCR α/β humano con un ratón transgénico HLA-A2.1 generado previamente por la Dra. Linda Sherman (Sherman y Lustgarten, Solicitud de Patente US 08/812.393 y documento WO 97/32603). Se reproducirán ambos ratones para producir un nuevo ratón que tendrá el alelo HLA-A2.1 y los loci de TCR α/β humanos. Este ratón también contendrá los loci de MHC clase I y II murinos endógenos puesto que no se ha llevado a cabo ninguna modificación adicional de estos loci. En el futuro puede ser deseable generar supresiones de los loci de MHC clase I y II murinos. En la presente discusión se ha limitado nuestra descripción a generar supresiones del TCR α/β murino que también son TCR α/β humanos y el transgénico HLA-A2. Se identificarán ratones positivos usando la hibridación Southern y citometría de flujo. Además, se generarán clones de células T reactivos a un antígeno peptídico definido presentado por moléculas de HLA-A2, y después se llevará a cabo el análisis de PCR de los reordenamientos VJ y VDJ. Esto también estará seguido de la caracterización adicional de la expresión de TCR en células T mediante tinción inmunofluorescente usando mAb específico de la familia V α y V β (véase el catálogo de Immunotech).

Ejemplo 7

Ensayo de los ratones transgénicos de TCR humano para TCR humano funcional:

Para evaluar la funcionalidad de los transgenes de TCR humanos, se teñirán células T aisladas de estos ratones con un panel de anticuerpos específicos para las regiones variables de TCR α y β humano, y se analizarán mediante citometría de flujo. Además, se aislará ARNm de estas células, y se examinará la estructura de los clones de ADNc de TCR.

Se aislarán células T esplénicas de ratones que contienen una supresión de las regiones constantes en los loci de las cadenas α y β de TCR murinos endógenos, y una única copia de los loci transgénicos de cadena α y cadena β de TCR humanos no reordenados. Estas células se teñirán con un panel de anticuerpos específicos para las regiones variables α o β humanas (de Coulter Immunotech), y se analizarán mediante citometría de flujo. Esto permitirá el análisis del número total y diversidad de células T con cadenas α y β funcionalmente reordenadas a evaluar. También se puede llevar a cabo la evaluación de la distribución proporcional de las diversas regiones variables en relación con su expresión en células T humanas.

También se aislará ARN poliadenilado a partir de ratones macho transgénicos TCR α/β humano de segunda generación de once semanas. Este ARN se usará para sintetizar ADNc monocatenario cebado con el oligonucleótido oligo-dT/SMART II (Clonetech). El ADNc resultante se usará entonces como molde para amplificaciones de PCR SMART RACE que usan cebadores oligonucleotídicos sintéticos específicos para las regiones constantes α o β humanas y la mezcla de cebadores Universal de Clonetech. Los fragmentos amplificados del tamaño apropiado se aislarán de geles de agarosa, se clonarán en pGEM T-Easy y se secuenciarán.

Las secuencias se examinarán en busca de la diversidad global de las cadenas codificadas por el transgén, enfocándose en el uso de los segmentos D y J, adición de la región N, distribución de la longitud de CDR3, y se examinará la frecuencia de las uniones que dan como resultado moléculas de ARNm funcionales.

Ejemplo 8

Inmunización y respuesta inmunitaria en un ratón transgénico TCR/HLA-A2:

Este ejemplo demuestra la inmunización exitosa y la respuesta inmunitaria en un animal transgénico de la presente invención.

Cebado peptídico de ratón transgénico (HuTCR α/β /muTCR α/β - HLA-A2.1) y propagación de líneas CTL:

A los ratones se les inyectó subcutáneamente en la base de la cola con 100 μ g del péptido 264 (aminoácidos 264-272 procedentes de la proteína supresora del tumor p53 humana) y 120 μ g del péptido auxiliar T sintético que se une a I-Ab que representa restos 128-140 de la proteína nuclear del virus de la hepatitis B (Sette, A., Vitiello, A., et al. (1994) J. Immunol. 153:5586) emulsionado en 100 μ l de adyuvante incompleto de Freund. Después de 10 días, las células del bazo de los ratones sensibilizados se cultivarán entonces con estimuladores de células de bazo activadas por lipopolisacárido (LPS), transgénicas A2.1 irradiadas que se pulsarán con el péptido de sensibilización indicado a 5 μ g/ml y beta 2-microglobulina humana a 10 μ g/ml. Después de 6 días, las células efectoras resultantes se ensayarán en un ensayo de liberación de ^{51}Cr de 4 h a diversas relaciones E/T para determinar la actividad lítica frente a células T2 que son pulsadas con el péptido de sensibilización indicado, un péptido de unión A2.1 no relacionado, o sin péptido. Se establecerán líneas CTL policlonales específicas para el péptido 264 (CTL A2 264) mediante reestimulación semanal de CTLs efectoras con células JA2 irradiadas que se pulsarán con 5 μ g del péptido 264, células de relleno de bazo C57BL/6 irradiadas y sobrenadante Con A de rata al 2% (vol/vol). Este protocolo se ha descrito por Theobald, M., et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92:11993.

Análisis de la reactividad de TCR humano y diversidad clonal:

La reactividad y especificidad de TCR se evaluará usando un ensayo de exterminio citotóxico *in vitro* y tinción inmunofluorescente con mAbs específicos anti-V α y anti-V β y tetrámeros 264/HLA-A2 (Altman, J., et al. (1996) Science 274:94-96). Las líneas CTL se propagarán y después se clonarán usando técnicas de dilución limitante estándar. Los clones individuales se evaluarán para determinar la especificidad mediante tinción con tetrámeros A2 que contienen el péptido 264 y con tetrámeros A2 que contienen un péptido irrelevante que no debería ser reconocido por los clones de células T específicos de 264, y en ensayos de exterminio citotóxicos. Los resultados de este ensayo serán útiles para demostrar la especificidad de TCR para el complejo del péptido 264/HLA-A2.1.

Para caracterizar la diversidad del repertorio de TCRs humanos en estos ratones transgénicos, se caracterizará además el uso de la familia variable α y β vía tinción con anticuerpo. Existen comercialmente varios mAbs específicos anti-V α y anti-V β que se usarán para determinar el uso global de la familia variable de los TCRs humanos. Además, se llevará a cabo el análisis de PCR SMART RACE (véase el Ejemplo 7 y a continuación) sobre clones de células T que demuestran especificidad por el complejo del péptido 264/HLA-A2.1. Se analizarán las secuencias para determinar las características mencionadas en el Ejemplo 7 y se evaluará el efecto de la expresión del transgén sobre la exclusión alélica.

Generación de líneas celulares que producen moléculas de TCR recombinantes:

A. Aislamiento de clones genómicos que corresponden a copias reordenadas y expresadas de cadenas α y β de TCR.

Se usarán células procedentes de un clon de hibridoma individual que reacciona para el complejo de antígeno peptídico/MHC de interés para preparar ADN genómico. Tales células pueden contener múltiples alelos de un gen de TCR dado. Por ejemplo, un hibridoma puede contener cuatro copias de los genes de TCR (dos copias de TCR procedentes de la línea celular de la pareja de fusión, y dos copias de TCR procedentes de la célula T original que expresa el TCR de interés). De estas cuatro copias, sólo una codifica el TCR de interés, a pesar del hecho de que varias de ellas pueden estar reordenadas. El procedimiento descrito en este ejemplo permite la clonación selectiva de la copia expresada de las cadenas α y β de TCR.

ADNc bicatenario:

Para el aislamiento de ARN total o poliA⁺, se usan células procedentes de hibridoma humano, o linfoma, u otra línea celular que sintetiza el TCR. El ARN se usa entonces para la síntesis de ADNc 5'-RACE-Ready usando la transcriptasa inversa enzimática y el oligo SMARTII (Clontech Laboratories, Manual de Usuario PT3269-1, Marzo de 1999). El ADNc monocatenario se usa entonces como molde para la síntesis de una segunda hebra (catalizada por Taq polimerasa) usando los siguientes oligonucleótidos como cebadores:

V β (cercano al término C) VW510: ATCCTTTCTCTTGACCATGGCCATC

V α (cercano al término C) VW512: GCTGGACCACAGCCGCAGCGTCATG

El ADNc bicatenario se aísla, se clona y se usa para determinar la secuencia nucleotídica de los ARNm que codifican las cadenas alfa y beta de la molécula de TCR expresada. Entonces se aíslan los clones genómicos de estos genes expresados. El procedimiento para clonar el gen de la cadena alfa expresado se explica más abajo.

Cadena alfa:

Entonces se usarán veinte a cuarenta nucleótidos de secuencia que abarcan la unión V-N-J para sintetizar una sonda única para aislar el gen a partir del cual se transcribe el mensaje de TCR. Este segmento nucleotídico sintético de ADN se denominará más abajo como o-alfa.

Entonces se sonda una transferencia Southern de ADN, aislado de la línea celular que expresa TCR y digerido individualmente y en combinaciones por pares con varias endonucleasas de restricción diferentes, con el oligonucleótido o-alfa único marcado con ³²P. Se identifica un sitio de endonucleasa de restricción único en dirección 5' del segmento V reordenado.

El ADN procedente de la línea celular que expresa TCR se corta con una enzima o enzimas de restricción apropiadas. El ADN se fracciona en tamaños mediante electroforesis en gel de agarosa. La fracción que incluye el fragmento de ADN que cubre el segmento V expresado se clona en lambda Gem-12 o EMBL3 SP6/T7 (Promega, Madison, WI o Clontech, Palo Alto, CA), o, si el fragmento es suficientemente pequeño, directamente en vectores de la serie pGEM. Los clones que contienen el segmento V se aíslan usando la sonda única o-alfa. El ADN de fragmento grande se aísla de clones positivos y se subclona en el poliligador de pGEM (Promega) o el equivalente. El clon resultante se denomina pgTRAr.

Cadena beta:

Entonces se usarán veinte a cuarenta nucleótidos de secuencia que abarcan la unión V-N-D-N-J para sintetizar una sonda única para aislar el gen a partir del cual se transcribe el mensaje de TCR. Este segmento nucleotídico sintético de ADN se denominará más abajo como o-beta.

Entonces se sonda una transferencia Southern de ADN, aislado de la línea celular que expresa TCR y digerido individualmente y en combinaciones por pares con varias endonucleasas de restricción diferentes, con el oligonucleótido o-beta único marcado con ³²P. Se identifica un sitio de endonucleasa de restricción único en dirección 5' del segmento V reordenado.

El ADN procedente de la línea celular que expresa TCR se corta con una enzima o enzimas de restricción apropiadas. El ADN se fracciona en tamaños mediante electroforesis en gel de agarosa. La fracción que incluye el fragmento de ADN que cubre el segmento V expresado se clona en lambda Gem-12 o EMBL3 SP6/T7 (Promega, Madison, WI o Clontech, Palo Alto, CA), o, si el fragmento es suficientemente pequeño, directamente en vectores de la serie pGEM. Los clones que contienen el segmento V se aíslan usando la sonda única o-alfa. El ADN de fragmento grande se aísla de clones positivos y se subclona en el poliligador de pGEM (Promega) o el equivalente. El clon resultante se denomina pgTRBr.

Construcción de vector de expresión de TCR de tres dominios y expresión en células de mamífero:

Los insertos clonados en pgTRAr y pgTRBr se amplifican entonces mediante PCR con los oligonucleótidos apropiados y se subclonan en un constructo de V α -V β /C β monocatenario de tres dominios en el vector pGem.

El TCR monocatenario de tres dominios se clonará entonces en el vector pSUN27 para la expresión como una proteína de fusión de cadena constante kappa de TCR monocatenario. El vector resultante se usa para transfectar células de ovario de hámster chino vía electroporación para generar líneas celulares que producen la proteína de fusión scTCR- κ soluble, de manera que se pueda evaluar la afinidad de unión a antígeno peptídico/molécula de HAL-A2.

Como alternativa, el ADN que codifica las cadenas alfa y beta, aislado de las células de hibridoma clonadas descritas anteriormente, se usa para construir los fragmentos V α , V β -C β requeridos para el TCR de tres dominios clonado en pGEM. Este constructo se transfiere entonces a pSUN27, y la proteína se produce y se evalúa como se describe anteriormente.

Ejemplo 9

Preparación de minilocus de HLA-A2:

Clonación de HLA-A2.1 a partir de LCL 721

5 SE aisló ADN genómico de la línea celular LCL 721 humana y se digirió con la enzima de restricción *Hind*III. El ADN genómico digerido con *Hind*III se selecciona por tamaños en un gel de agarosa al 0,7%, y el ADN fraccionado se purifica. El ADN genómico purificado se liga entonces en el sitio de *Hind*III de pBR3222. El ADN ligado se transforma en LE392 de *E. coli*. Las bacterias recombinantes que contienen el gen de HLA-A2 se detectan mediante hibridación de colonias (Hanahan, D. y M. Meselson (1980) Gene 10:63-67), usando como sonda el oligonucleótido sintético 5'-TGCTCCCCGTCCTCAAT-3'. Subsiguientemente, el fragmento de 5,1 kb clonado, que contiene el gen de HLA-A2, se subclona en el pcDNA3.1(+) del sitio de *Hind*III (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Producción y detección de ratones transgénicos HLA-A2.1

15 Entonces se producen ratones transgénicos usando un protocolo estándar (Hogan, G. et al. (1986) Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) inyectando el pcDNA3.1(+) linealizado que posee el gen HLA-A2 en huevos fertilizados obtenidos cruzando ratones (C57BL/6J x DBA/2)F1. Se establecieron líneas transgénicas a partir de ratones que poseen el transgén según se detecta mediante análisis de transferencia de punto de ADN de la cola. Se seleccionan dos líneas transgénicas basándose en la expresión del producto transgénico sobre la superficie celular. Para detectar la expresión de HLA-A2 en la superficie celular, se tratan células de bazo o sangre periférica (0,5 ml) recogida de la vena de la cola de ratones de ensayo con cloruro de amonio tamponado con Tris (5 ml), para lisar los glóbulos rojos. Las células se lavan y se resuspenden en RPMI al 10% suplementado con 2,5 µg/ml de ConA, 250 ng/ml de ionomicina, 3 ng/ml de PMA, y 5% de sobrenadante de cultivo de esplenocitos de rata activados con Con A. Las muestras se incuban a 3×10^6 células/pocillo en un volumen de 2 ml durante 3 días a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%. La expresión de HLA-A2.1 sobre la superficie celular se evalúa mediante citometría de flujo (FACS; Becton Dickinson & Co, Mountain View, CA) usando un mAb específico de HLA-A2.1 biotinilado BB7.2 (Parham, P. et al. (1981) Hum. Immunol. 3:277) y estreptavidina conjugada con PE (Biomedica, Foster City, CA). Las células se analizan usando un citómetro de flujo. Se mantiene una línea transgénica mediante retrocruzamiento a B10.D22, y la otra línea transgénica mediante retrocruzamiento a C57BL/6J. Las descendencias heterocigotas se retrocruzan a animales C57BL/6J o B10.D22, y después se entrecruzan en la generación N2 para dar lugar a razas homocigotas independientes.

Ejemplo 10

Generación de ratones que son negativos para ambos loci α y β de TCR murino (MuTCR α - β - o MuTCR α KO/ β KO):

Este ejemplo describe la creación de una raza de ratón que es negativa para ambos loci alfa y beta del TCR. Esto se logrará reproduciendo un ratón homocigoto para la supresión de cadena de TCR α con un homocigoto para la supresión de cadena de TCR β .

35 A fin de generar ratones homocigotos tanto para la supresión de cadena de TCR α (véase el Ejemplo 1) como la supresión de cadena de TCR β (véase el Ejemplo 2), se reproduce en ratones homocigotos para cada supresión para generar descendencia heterocigota en cada locus. Estos heterocigotos se cruzan, y la descendencia resultante se identifica mediante análisis de transferencia Southern. La identificación en busca de la presencia de la supresión de la cadena β se lleva a cabo mediante análisis de transferencia Southern de ADN digerido con *Bam*HI de biopsias de la cola, usando la sonda B descrita en el Ejemplo 2 (véase la FIG. 2a). Aquellas descendencias que muestren una banda de 7,4 kb indicativa de una supresión de la cadena β y que carecen de la banda de tipo salvaje de 10,4 kb se identifican adicionalmente en busca de la presencia de la cadena α inactivada. Para identificar transferencias Southern de ADN digerido con *Bam*HI, se usó la sonda A procedente del Ejemplo 1 (sonda de la cadena α , véase la FIG. 1d). Esta sonda detecta un fragmento de 8,9 kb en el locus de tipo salvaje, y una banda de diagnóstico de 2,4 kb en una supresión de cadena α . La ausencia de secuencias de ADN de tipo salvaje se confirma sondando el ADN digerido con *Bam*HI con una sonda del exón 2 de C α y la sonda o sondas de C β 1 y/o C β 2, y no encontrando bandas que se hibriden. Esta combinación de ensayos de diagnóstico indicaría la generación de un nuevo ratón en el que se han inactivado ambas copias de los loci α y β de TCR murino mediante supresión como resultado de la mutación seleccionada como diana. Este ratón se denominaría un ratón MuTCR α - β - o MuTCR α KO/ β KO.

REFERENCIAS

U.S.S.N 09/422.375, U.S.S.N. 08/943.086, y U.S.S.N. 08/813.781 WO97/32603 12 de septiembre de 1997

Pat. US 5.877.397, Pat. US 6.150.584A WO 98/24893 A2, 11 de junio de 1998, USSN 08/812.393

Janeway y Travers, Immunobiology 1997

Chung S. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 12654-12658

- Rothe J. *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 11-17
- Viney J.L. *et al.* (1992) *Hybridoma* 11: 701-713
- Evans, M. J., *et al.* (1981) *Nature* 292: 154-156
- Bradley, M. O., *et al.* (1984) *Nature* 309: 255-258
- 5 Gossler, *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 9065-9069
- Robertson, *et al.* (1986) *Nature* 322: 445-448
- Jaenisch, R. (1988) *Science* 240: 1468-1474
- Jaenich, R. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73: 1260-1264
- 10 Hogan, *et al.* (1986) *en Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Brinster, *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 4438-4442
- Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994) 91: 9302-9306
- Proc. Natl. Acad. Sci.* (1996) 93: 10933-10938
- Curr. Opin. Biotechnol.* (1994) 5: 521-527
- 15 Momberts, *et al.* (1991) *PNAS* 88:3084-3087
- Momberts, *et al.* (1992) *Nature* 360: 225-231
- Samuelson, *et al.* (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 6972
- Acuto, *et al.* (1983) *Cell* 34: 717
- MacIntyre, *et al.* (1983) *Cell* 34: 737
- 20 Hendrick, *et al.* (1984) *Nature* 308: 149
- Hendrick, *et al.* (1984) *Nature* 308: 153
- Yanagi, *et al.* (1984) *Nature* 308: 145
- Saito, *et al.* (1987) *Nature* 325: 125
- Chien, *et al.* (1984) *Nature* 312: 314
- 25 Davis y Bjorkman (1988) *supra*
- Kronenberg, *et al.* (1986) *Ann. Rev. Immunol.* 4: 529
- Acuto, *et al.* (1983) *supra*.
- Kappler, *et al.* (1983) *Cell* 35: 295
- Rowen, *et al.* (1996), *Science* 272: 1755
- 30 Akira (1987) *Science* 238: 1134
- Yancopoulos, *et al.* (1986) *supra*
- Chien, *et al.* (1987) *supra*
- Pardoll, *et al.* (1987) *Nature* 326: 79
- Raulet, *et al.* (1985) *Nature* 312: 36
- 35 Samelson, *et al.* (1985) *Nature* 315: 765
- Snodgrass, *et al.* (1985) *Nature* 315: 232
- Berman *et al.*, *EMBO J.* (1988) 7: 727-738

- Fugger, *et al.* (1994) PNAS 91: 6151-6155
- Medsen, *et al.* (1999) Nature Genetics 23: 343-347
- Kieffer, *et al.* (1997) J. Immunol. 159: 4907-4912
- 5 Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach, E. J. Robertson, ed., IRL Press, Washington, D.C., 1987
- Zijlstra, *et al.* (1989) Nature 342:435-438
- Schwartzberg *et al.* (1989) Science 246:799-803
- J. Sambrook, *et al.* en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 10 "Antibodies: A Laboratory Manual", Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)
- Mansour, *et al.* (1988), Nature 336:348-352
- McMahon and Bradley (1990), Cell 62:1073-1085
- Robertson, E. J. (1987) en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. E. J. Robertson, ed. (Oxford: IRL Press), p. 71-112
- 15 Genome Analysis: A Laboratory Manual, Volumen 3 (1999), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Hooper, *et al.* (1987) Nature 326:292-295
- Doetschman, *et al.* (1985) J. Embryol. Exp. Morph. 87:27-45
- Robertson, *et al.* (1986) Nature 323:445-448
- 20 Hasty, *et al.* (1991), Nature, 350:243-246
- Laird, *et al.* (1991), Nucl. Acids Res. 19:4293
- Bradley, A. (1987) en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. E. J. Robertson, ed. (Oxford: IRL Press), p. 113-151
- Burke, D.T., Carle, G.F. y Olson, M.V. (1987) Science 236:806
- 25 Bruggemann, M, y Neuberger, M.S. (1996) Immunol. Today 7:391
- Cooke, H. y Cross, S. (1988) Nucleic Acids Res. 16: 11817
- Luzzatto, L. (1960) Biochem. Biophys. Res. Commun. 2:402 Methods in Enzymology (1991) 194:251-270
- Burgers, P.M.J. y Percival, K.J. (1987) Anal. Biochem. 163: 391-397
- 30 Brownstein, B.H., Silverman, R.D., Little, R.D., Burke, D.T., Korsmeyer, S.J., Schlessinger, D., y Olson, M.V. (1989) Science 244: 1348
- Pachnis, V., Pevny, L., Rothstein, R., y Constantini, F. (1990) PNAS 87: 5109-5113
- Huxley, C. y Gnirke, A., (1991) Bioessays, 13:545-550; Davies, N.P. y Huxley, C. (1996) en Methods in Molecular Biology, Vol. 54: YAC Protocols. Eds. D. Markie. Humana Press Inc., Tolowa, NJ.
- 35 Montolui, L. (1996) en Methods in Molecular Biology, Vol.54: YAC Protocols. Eds. D. Markie. Humana Press Inc., Tolowa, NJ
- Davies, N.P., Popov, A.V., Zou, X., y Bruggemann, M. (1996) en Antibody Engineering: A practical Approach. Eds. J. McCafferty, H.R. Hoogenboom, y D.J. Chiswell. IRL Press, Oxford. p. 59-76
- Hogan, B.R., Beddington, F., Costantini, F. y Lacy, E. (1994) Manipulating the Mouse embryo: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. p. 477
- 40 Sette, A., Vitiello, A., *et al.* (1994) J. Immunol. 153:5586
- Theobald, M., *et al.* (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92:11993

Altman, J., *et al.* (1996) Science 274:94-96

Clonotech Laboratories, User Manual PT3269-1, marzo de 1999

Hanahan, D, y M. Meselson (1980) Gene 10:63-67

Parham, P. *et al.* (1981) Hum. Immunol. 3:277

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SUNOL MOLECULAR CORPORATION

<120> ANIMALES TRANSGÉNICOS QUE COMPRENDEN UN SISTEMA INMUNITARIO HUMANIZADO

<130> 13448EP

<140> 01 994 325.7

10 <141> 19-12-2001

<150> US 60/256,591

<151> 19-12-2000

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

15 <210> 1

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

<400> 1

actgggatcc aatgagtct tcgg 24

<210>2

<211> 32

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

<400> 2

30 actggcggcc gccaaacgac ccaacaccg tg 32

<210>3

<211> 44

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 3

cccacctgga tctcccagat ttgtgaggaa ggttgctgga gagc 44
 <210>4
 <211> 45
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda oligonucleotídica
 <400> 4
 ggaagccct gctggctcca agatggctga gggaaagtc tacgg 45
 10 <210>5
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 5
 tagtgatcc catgcagaga gaaaccgaag tacgtg 36
 <210>6
 <211> 26
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 6
 25 gctacagagt gaagtcatgg atcctg 26
 <210>7
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 7
 ggtctgtgtt ccatatgacg tcagtacg 28
 <210>8
 35 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 8
 attacatag ggtcctaact taggtcagaa ctcatgatgc 39
 5 <210>9
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda oligonucleotídica
 <400> 9
 cgttcctgt gatgccacgt tgactgagaa aagctttg 38
 <210> 10
 <211> 40
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda oligonucleotídica
 <400> 10
 20 tgagaaagtc caaaaactcg ggtaccatt ccacataga 40
 <210> 11
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda oligonucleotídica
 <400> 11
 ggagtaacc tgggtgtgc tcagcagtt cttggactc ctgtg 45
 <210> 12
 30 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Ligador
 35 <400> 12
 gatccgtaa cgc 13
 <210> 13

<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Ligador
<400> 13
gcaattgcg cgg 13
<210> 14
<211> 28
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
<400> 14
15 ggattcaaag gttacctat gtggccac 28
<210> 15
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
<400> 15
gccccaaagg cctaccgct tcc 23
<210> 16
25 <211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido poliligador
30 <400> 16
aattggccg gccccggg gcgccg 28
<210> 17
<211> 28
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido poliligador

<400> 17
 aattcggcgc gccccgcggg gccggccg 28
 <210> 18
 <211> 46
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda oligonucleotídica
 <400> 18
 10 gtctctact tactaaaaat acaaaaatta gccaggtgtg gtggtg 46
 <210> 19
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda oligonucleotídica
 <400> 19
 gtcacagggc tgaggaagg agacaagagc ctggacagca 40
 <210> 20
 20 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 25 <400> 20
 atccttctc ttgacatgg ccatc 25
 <210> 21
 <211> 25
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 <400> 21
 gctggaccac agccgcagcg tcatg 25
 35 <210> 22
 <211> 17
 <212> ADN

ES 2 389 251 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 22

5 tgtctcccg tccaat 17

REIVINDICACIONES

1. Un animal transgénico no humano capaz de producir TCR humano con un repertorio de TCRs sustancial, que comprende:
 loci del receptor de células T endógeno inactivados que son loci del receptor de cadena α y β ; y
 5 transgenes contenidos en su genoma compuesto de loci del receptor de células T humano que son loci del receptor de cadena α y β ;
 en el que dichos loci del receptor de células T humano no están reordenados.
2. El animal transgénico no humano de la reivindicación 1, en el que dichos loci del receptor de células T humano están compuestos, en enlazamiento operable, de una pluralidad de genes V del receptor de células T humano, y genes D y/o J y C.
 10
3. El animal transgénico no humano de una de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicho animal es capaz de reordenamiento VDJC productivo y expresar receptores de células T humanos.
4. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dichos transgenes sufren reordenamiento VDJC productivo en linfocitos de dicho animal transgénico no humano, y en el que las células T expresan cantidades detectables de TCR transgénico en respuesta a la estimulación antigénica.
 15
5. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho animal transgénico no humano produce una respuesta inmunitaria frente a un antígeno, comprendiendo dicha respuesta inmunitaria una población de células T que reaccionan frente a un antígeno, y en el que los receptores de células T comprenden un receptor de células T humano.
- 20 6. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que un receptor de células T humano producido está compuesto de cadenas α y β humanas.
7. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además:
 transgenes contenidos en su genoma compuesto de genes HLA humanos de loci de MHC humanos.
- 25 8. El animal transgénico no humano de la reivindicación 7, en el que dichos loci de MHC contienen todos los genes HLA humanos.
9. El animal transgénico no humano de la reivindicación 7, en el que dichos loci de MHC contienen una porción de los genes HLA humanos.
10. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en el que dichos genes HLA humanos son MHC clase I y MHC clase II.
- 30 11. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en el que dicho animal transgénico no humano produce una respuesta inmunitaria frente a un antígeno, comprendiendo dicha respuesta inmunitaria una población de células T que reaccionan frente a un antígeno presentado por receptores de MHC clase I humanos, y/o que reaccionan frente a un antígeno presentado por receptores de MHC clase II humanos.
- 35 12. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en el que dichos genes HLA humanos son MHC clase I.
13. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 7-12, en el que dichos genes HLA humanos son HLA-A2.
14. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 7-13, en el que dicho animal transgénico no humano produce una respuesta inmunitaria frente a un antígeno, comprendiendo dicha respuesta inmunitaria una población de células T que reaccionan frente a un antígeno presentado por receptores de MHC clase I humanos.
 40
15. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, en el que dichos genes HLA humanos son MHC clase II.
- 45 16. El animal transgénico no humano de la reivindicación 15, en el que dicho animal transgénico no humano produce una respuesta inmunitaria frente a un antígeno, comprendiendo dicha respuesta inmunitaria una población de células T que reaccionan frente a un antígeno presentado por receptores de MHC clase II humanos.
17. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 7-16, en el que dicho animal transgénico no humano produce una respuesta inmunitaria frente a un antígeno, comprendiendo dicha respuesta

inmunitaria una población de células T que reaccionan frente a un antígeno, y en el que los receptores de células T comprenden cadenas α y β humanas.

18. Un animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además genes contenidos en su genoma un correceptor humano.

5 19. El animal transgénico no humano de la reivindicación 18, en el que dichos genes codifican un correceptor CD8 y/o un correceptor CD4.

10 20. El animal transgénico no humano de la reivindicación 18 o reivindicación 19, en el que dicho animal transgénico no humano produce una respuesta inmunitaria frente a un antígeno, comprendiendo dicha respuesta inmunitaria una población de células T que reaccionan frente al antígeno, y en el que los receptores de células T comprenden receptores de células T humanos y moléculas correceptoras.

21. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 18-20, en el que dicho animal transgénico no humano produce una respuesta inmunitaria frente a un antígeno, comprendiendo dicha respuesta inmunitaria una población de células T que reaccionan frente a antígeno presentado por receptores de MHC clase I humanos, y/o que reaccionan frente a un antígeno presentado por receptores de MHC clase II humanos.

15 22. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 18-21, en el que dicho correceptor es un correceptor CD8.

20 23. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 18-22, en el que dicho animal transgénico no humano produce una respuesta inmunitaria frente a un antígeno, comprendiendo dicha respuesta inmunitaria una población de células T que reaccionan frente al antígeno y en el que las células T expresan sobre su superficie celular receptores de células T humanos y moléculas correceptoras CD8.

24. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 18-23, en el que dicho animal transgénico no humano produce una respuesta inmunitaria frente a un antígeno, comprendiendo dicha respuesta inmunitaria una población de células T que reaccionan frente a antígeno presentado por receptores de MHC clase I humanos.

25 25. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 18-21, en el que dicho correceptor es un correceptor CD4.

30 26. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 18-21 y 26, en el que dicho animal transgénico no humano produce una respuesta inmunitaria frente a un antígeno, comprendiendo dicha respuesta inmunitaria una población de células T que reaccionan frente al antígeno y en el que las células T expresan sobre su superficie celular receptores de células T humanos y moléculas correceptoras CD4.

27. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 18-21, 25 y 26, en el que dicho animal transgénico no humano produce una respuesta inmunitaria frente a un antígeno, comprendiendo dicha respuesta inmunitaria una población de células T que reaccionan frente a antígeno presentado por receptores de MHC clase II humanos.

35 28. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho animal es cualquier animal que se puede manipular transgénicamente.

29. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, en el que dicho animal es un ratón.

40 30. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, en el que dicho animal es una rata.

31. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, en el que dicho animal es un primate.

32. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, en el que dicho animal es un chimpancé.

45 33. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, en el que dicho animal es una cabra.

34. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, en el que dicho animal es un cerdo.

50 35. El animal transgénico no humano de una cualquiera de las reivindicaciones 1-28, en el que dicho animal es un pez zebra.

36. Un método para producir un animal transgénico no humano según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

inactivar loci de receptores de células T endógenos que son loci de receptores de célula T de cadena α y β en un embrión no humano o una célula madre embrionaria no humana;

5 insertar transgenes que contienen loci de receptores de células T humanos activos que son loci de receptores de cadenas α y β en dicho embrión no humano o célula madre embrionaria no humana;

producir un animal transgénico a partir de dicho embrión no humano o célula madre embrionaria no humana que contiene el transgén humano activo, en el que el animal es capaz de producir células T que expresan receptores de células T humanos; y

10 reproducir el animal transgénico según sea necesario para producir el animal transgénico de la reivindicación 1.

37. Un método para producir un animal transgénico no humano según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:

15 inactivar loci de receptores de células T endógenos en un embrión no humano o célula madre embrionaria no humana, en el que dichos loci son loci de receptores de células T α o de receptores de células T β ;

producir un animal transgénico a partir de dicho embrión no humano o célula madre embrionaria no humana que contiene loci activados, en el que el animal es incapaz de expresar dichos loci endógenos;

cruzar un animal transgénico producido que tiene loci de receptores de células T α endógenos inactivados con un animal transgénico producido que tiene loci de receptores de células T β endógenos inactivados;

20 seleccionar la progenie que tiene los loci tanto de los receptores de células T α como de los receptores de células T β endógenos inactivados;

insertar transgenes que contienen loci de receptores de células T humanos activos en un embrión no humano o célula madre embrionaria no humana, en el que dichos loci de receptores de células T humanos son loci de receptores de células T α o de receptores de células T β humanos;

25 producir un animal transgénico a partir de dicho embrión no humano o célula madre embrionaria no humana que contiene el transgén humano activo;

cruzar un producto transgénico animal que tiene transgenes de receptores de células T α humanos activos con un animal transgénico producido que tiene transgenes de receptores de células T β humanos activos;

30 seleccionar la progenie que tiene los transgenes tanto de los receptores de células T α como de los receptores de células T β humanos activos, en el que el animal es capaz de producir células T que expresan receptores de células T humanos;

cruzar un animal transgénico producido que tiene loci tanto de los receptores de células T α como de los receptores de células T β endógenos inactivados con un animal transgénico producido que tiene transgenes tanto de receptores de células T α como de receptores de células T β humanos activos;

35 seleccionar la progenie que tiene loci de receptores de células T α y de receptores de células T β endógenos inactivados y que contiene transgenes de receptores de células T α y de receptores de células T β humanos activos; y

reproducir el animal transgénico según sea necesario para producir el animal transgénico de la reivindicación 1.

40 38. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 36-37, en el que dichos loci de receptores de células T endógenos se inactivan mediante una limitación funcional de los loci.

39. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 36-37, en el que dichos loci de receptores de células T endógenos se inactivan suprimiendo los genes del segmento J a partir de dichos loci.

45 40. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 36-37, en el que dichos loci de receptores de células T endógenos se inactivan suprimiendo los genes del segmento D de dichos loci.

41. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 36-37, en el que dichos loci de receptores de células T endógenos se inactivan suprimiendo los genes del segmento C de dichos loci.

42. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 36-37, en el que dichos loci de receptores de células T humanos están no reordenados.
43. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 36-37, en el que dichos transgenes que contienen los loci de receptores de células T humanos comprenden, en enlazamiento operable, una pluralidad de genes V y genes D y/o J y C de receptores de células T humanos.
44. Un método para producir un animal transgénico no humano según la reivindicación 1, capaz además de producir moléculas heterólogas de MHC, que comprende las etapas de:
- cruzar un animal transgénico que expresa receptores de clls T humanos producidos mediante el método de la reivindicación 36 con un animal transgénico que contiene loci de MHC humano y que expresa moléculas de MHC humano;
- seleccionar la descendencia de animales transgénicos que expresan receptores de células T humanos y moléculas heterólogas de MHC; y
- reproducir el animal transgénico según sea necesario para producir el animal transgénico de la reivindicación 1, capaz además de producir moléculas heterólogas de MHC.
45. El método de la reivindicación 44, en el que dichos loci de MHC contienen todos los genes HLA humanos.
46. El método de la reivindicación 44, en el que dichos loci de MHC contienen una porción de los genes HLA humanos.
47. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 44-46, en el que dichos genes HLA humanos son MHC clase I y MHC clase II.
48. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 44-47, en el que dichos genes HLA humanos son MHC clase I.
49. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 44-47, en el que dichos genes HLA humanos son MHC clase II.
50. Un método para producir un animal transgénico no humano según la reivindicación 1, capaz además de producir moléculas heterólogas de MHC, y moléculas de correceptores heterólogos, que comprende las etapas de:
- cruzar un animal transgénico que expresa receptores de células T humanos y moléculas heterólogas de MHC producidos mediante el método de la reivindicación 44 con un animal transgénico que contiene genes de correceptor heterólogo;
- seleccionar progenie de los animales transgénicos que expresan receptores de células T humanos, moléculas heterólogas de MHC, y moléculas de correceptores heterólogos; y
- reproducir el animal transgénico según sea necesario para producir el animal transgénico de la reivindicación 1, capaz además de producir moléculas heterólogas de MHC y moléculas de correceptores heterólogos.
51. El método de la reivindicación 50, en el que dicho correceptor heterólogo es un correceptor CD8 y un correceptor CD4.
52. El método de la reivindicación 50, en el que dicho correceptor heterólogo es un correceptor CD8.
53. El método de la reivindicación 50, en el que dicho correceptor heterólogo es un correceptor CD4.
54. Un método para generar una línea celular inmortal capaz de producir receptores de células T humanos, que comprende las etapas de:
- producir un animal transgénico capaz de producir receptores de células T humanos mediante el método de la reivindicación 37;
- inducir una respuesta inmunitaria en dicho animal;
- aislar una célula T que expresa receptores de células T humanos; y
- fusionar la célula T aislada con una estirpe celular immortalizante para generar una estirpe celular inmortal capaz de producir receptores de células T humanos.
55. El método de la reivindicación 54, en el que dicha célula T aislada expresa TCR específico para un antígeno particular de interés.

56. El método de la reivindicación 54 o reivindicación 55, en el que dicha célula T aislada expresa TCR capaz de reaccionar con un complejo péptido/MHC de interés.

57. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 54-56, en el que dicha estirpe celular inmortalizante es una estirpe celular de mieloma.

5 58. El animal transgénico no humano de la reivindicación 1, que contiene además en su genoma transgenes que comprenden, en enlazamiento operable, una pluralidad de genes V y sus genes D y/o J y C de receptores de células T humanos.

59. El animal transgénico no humano de la reivindicación 1, en el que los transgenes contenidos en su genoma están contenidos en la línea germinal.

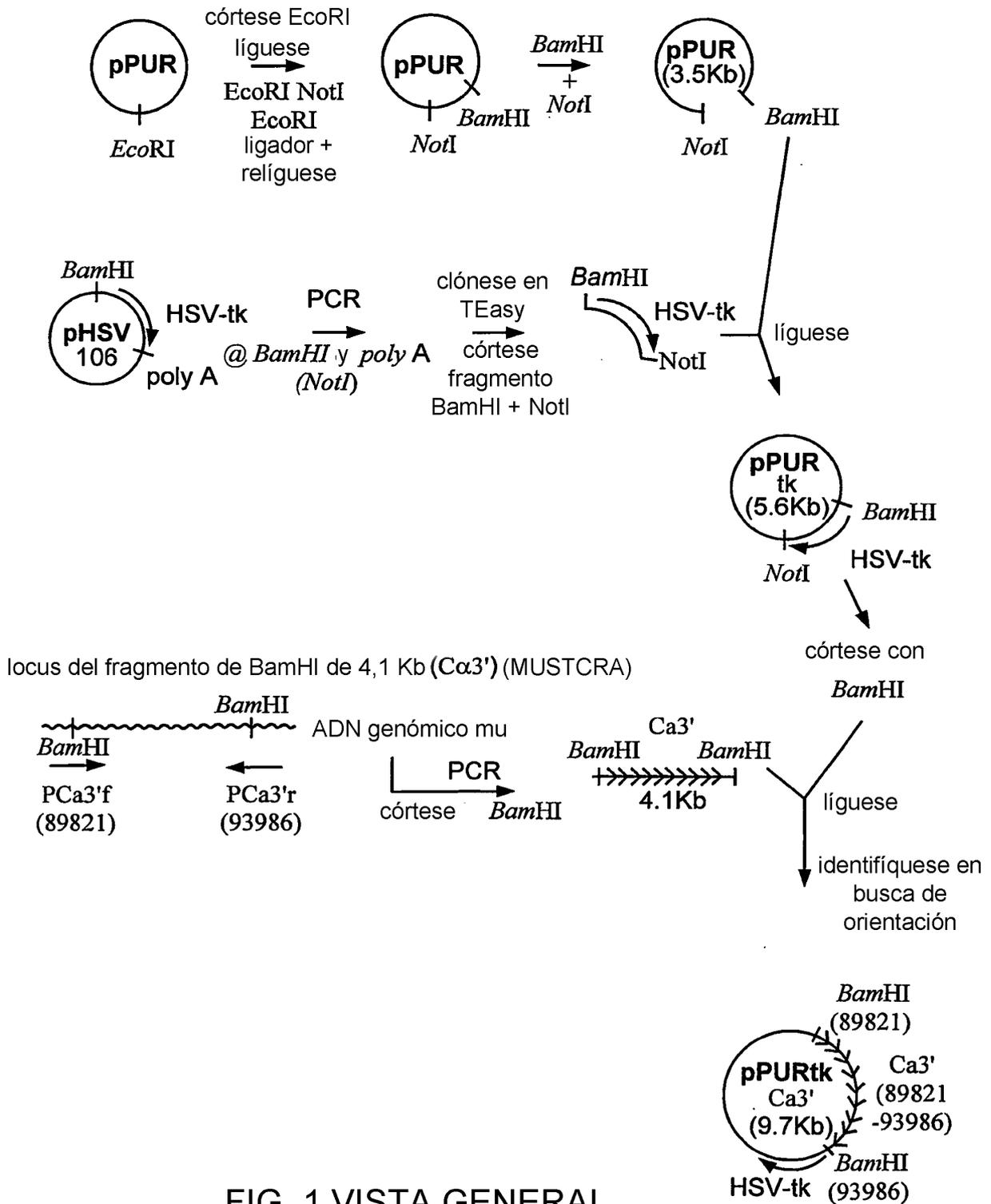


FIG. 1 VISTA GENERAL

locus del fragmento de *NdeI* de 4,8 Kb (*Ca5'*) MUSTCRA

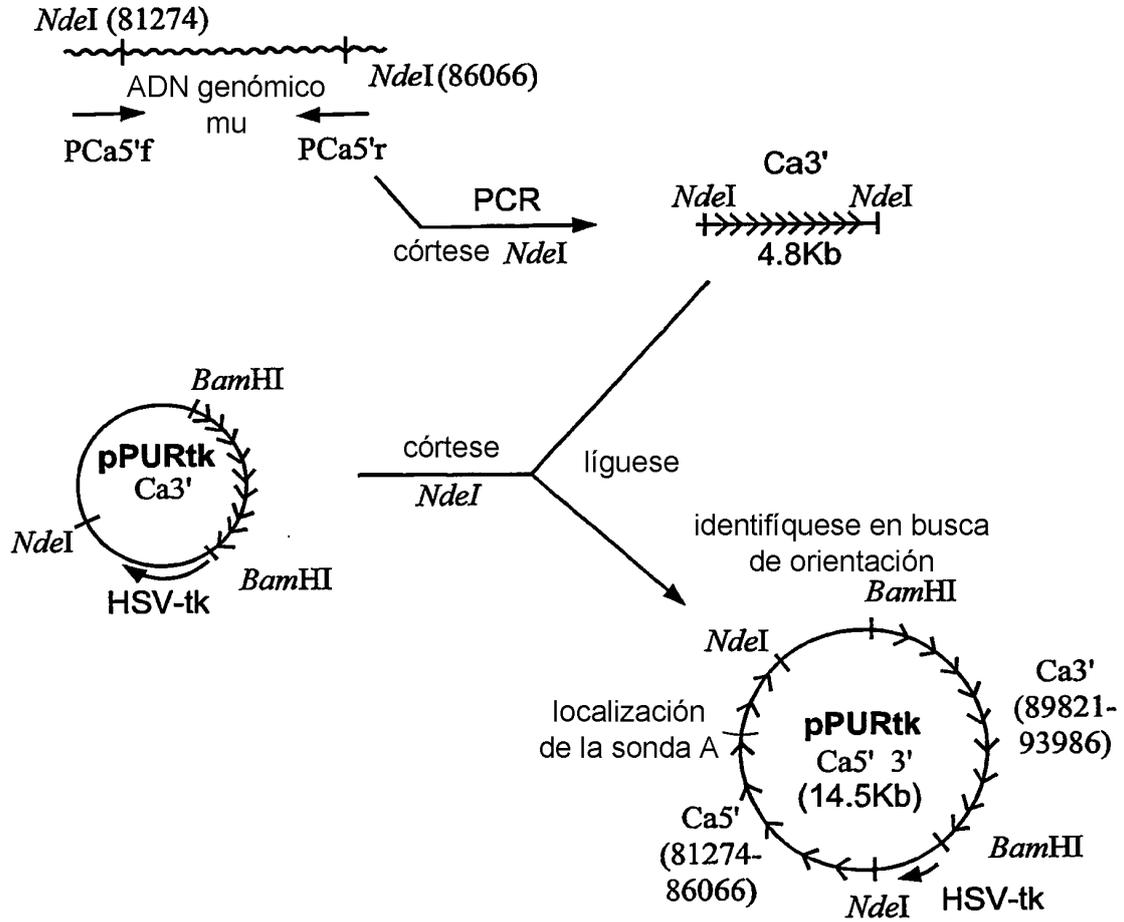


FIG. 1 VISTA GENERAL CONT.

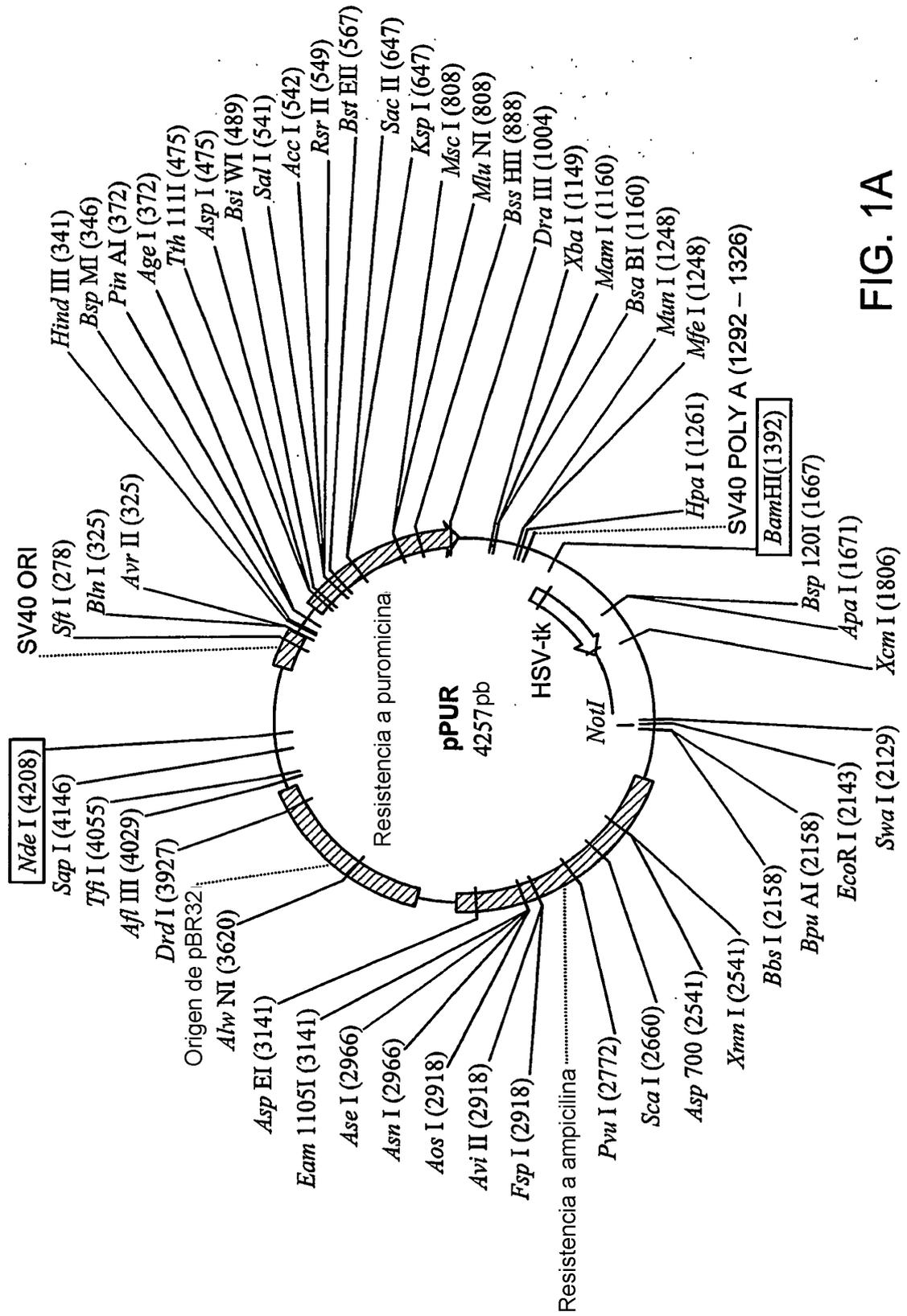
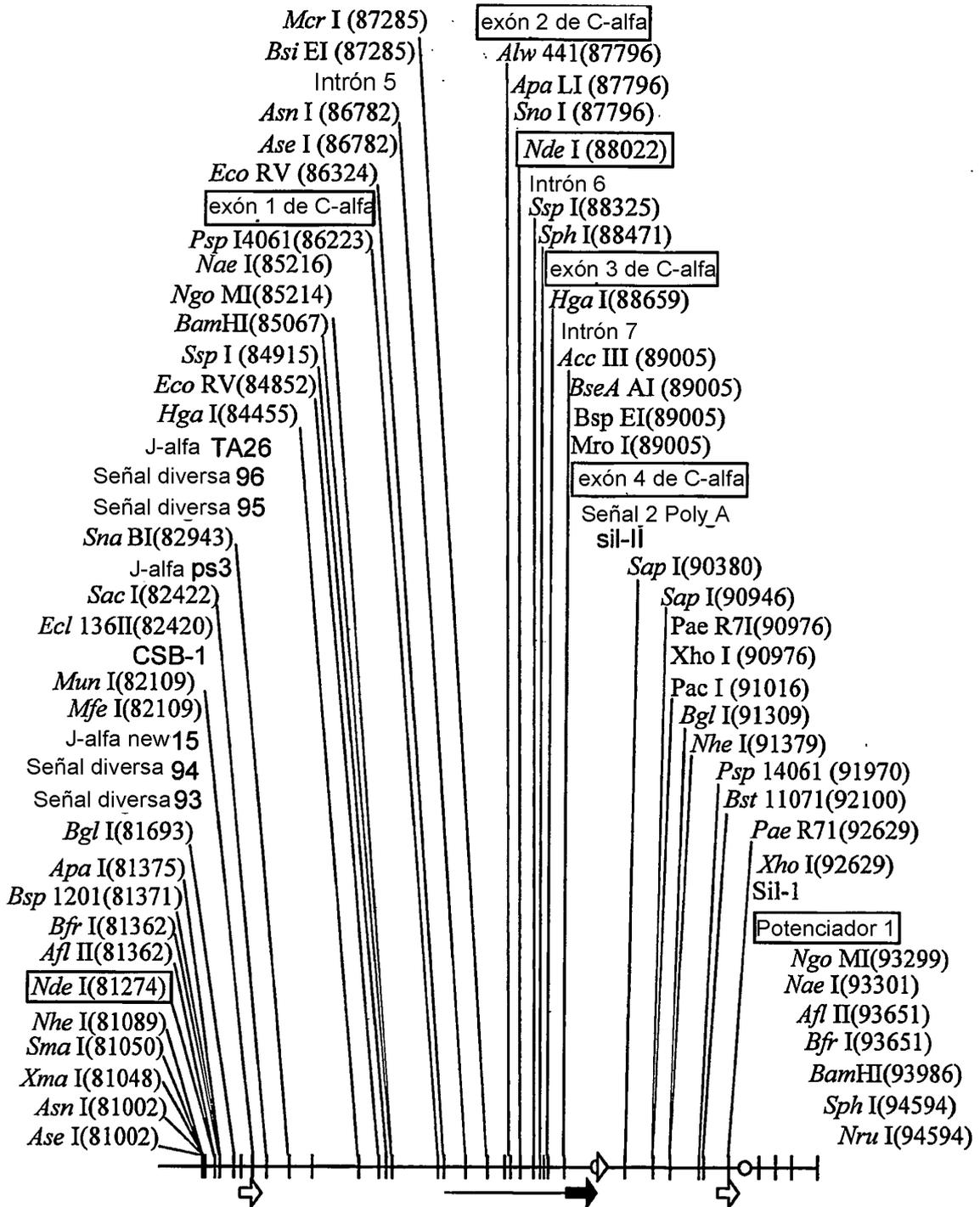


FIG. 1A



Fragmento de muTCR α , locus δ (MUSTCRA)
 14512 pb (molécula 94647 pb)

FIG. 1B

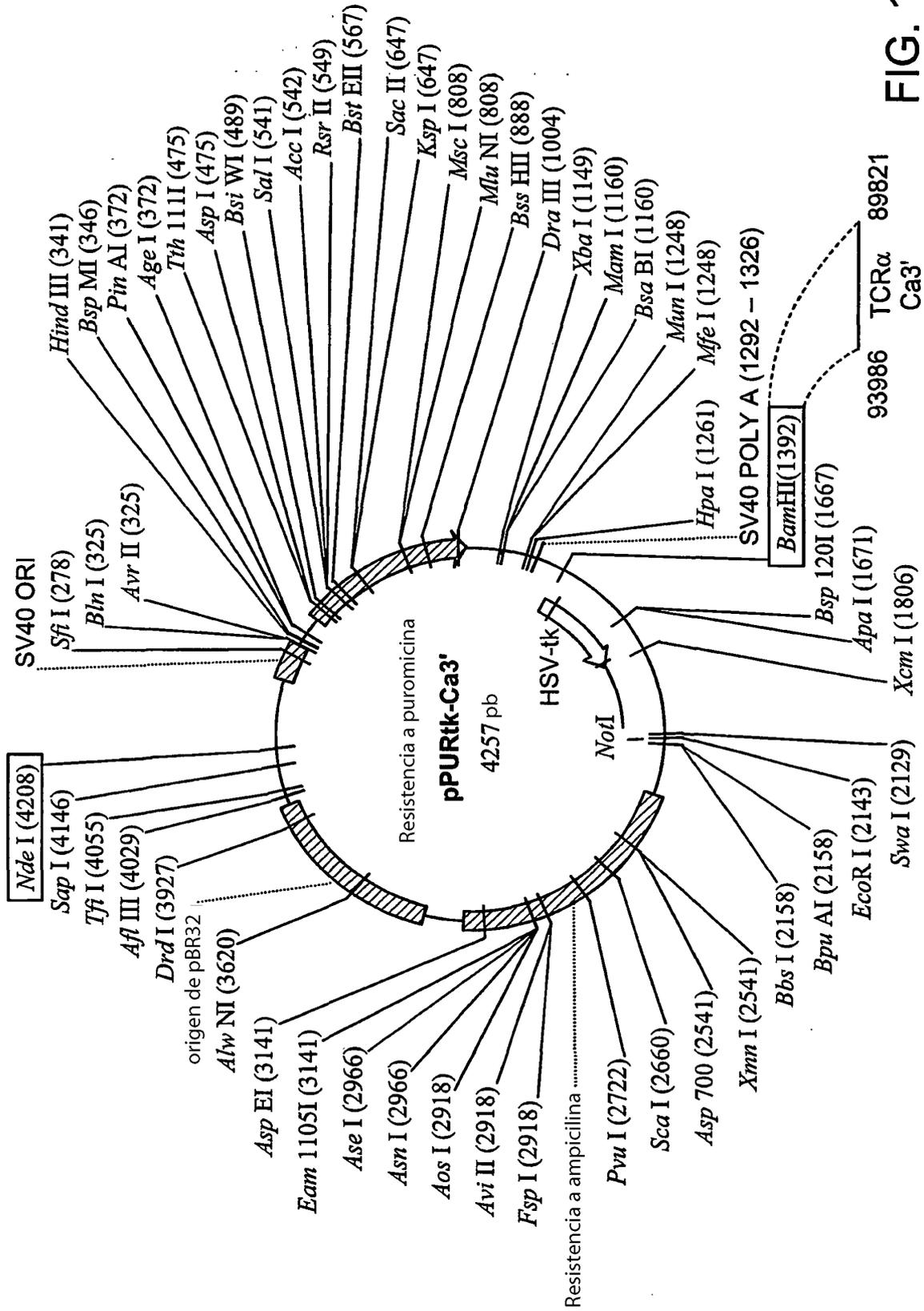


FIG. 1C

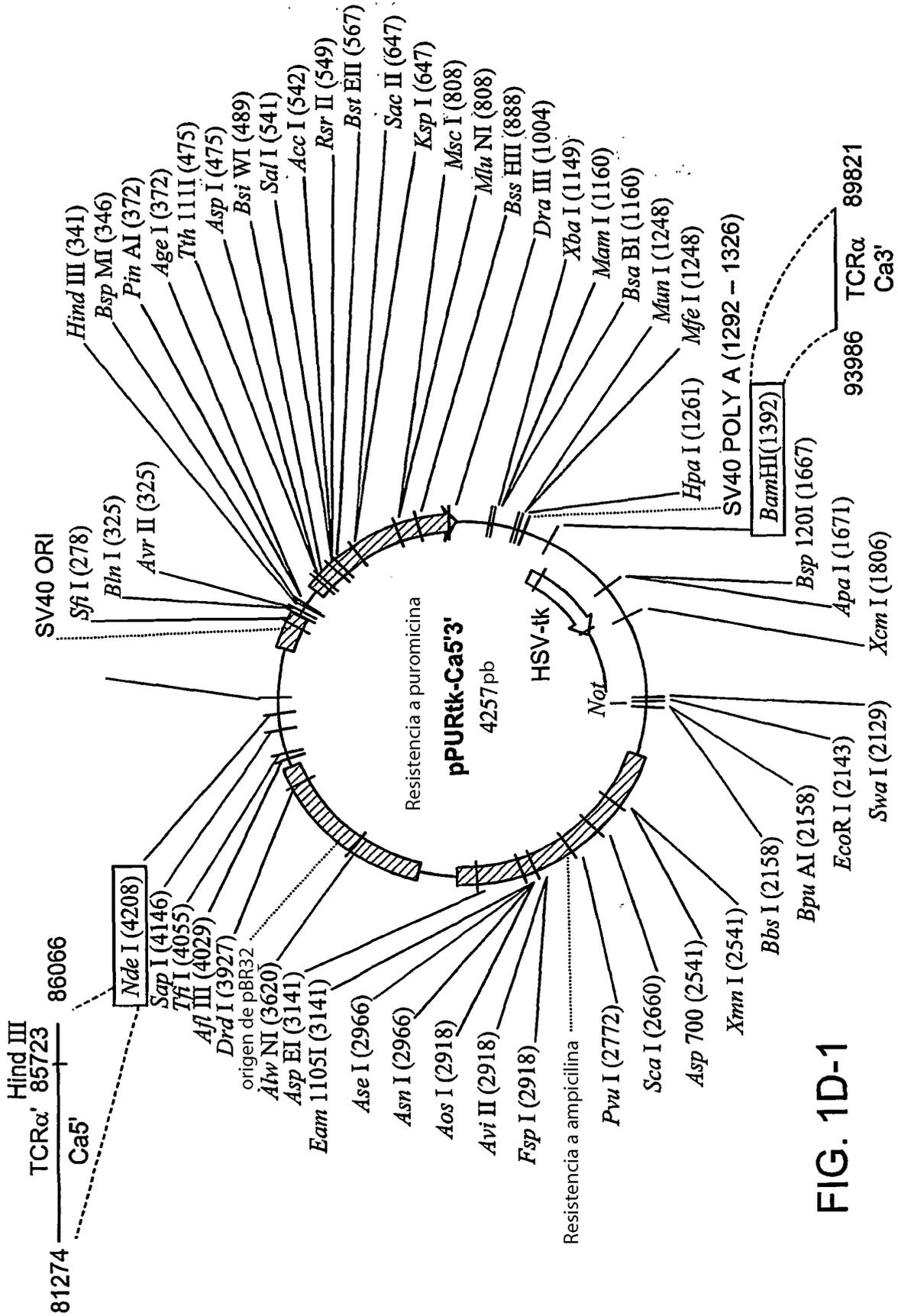


FIG. 1D-1

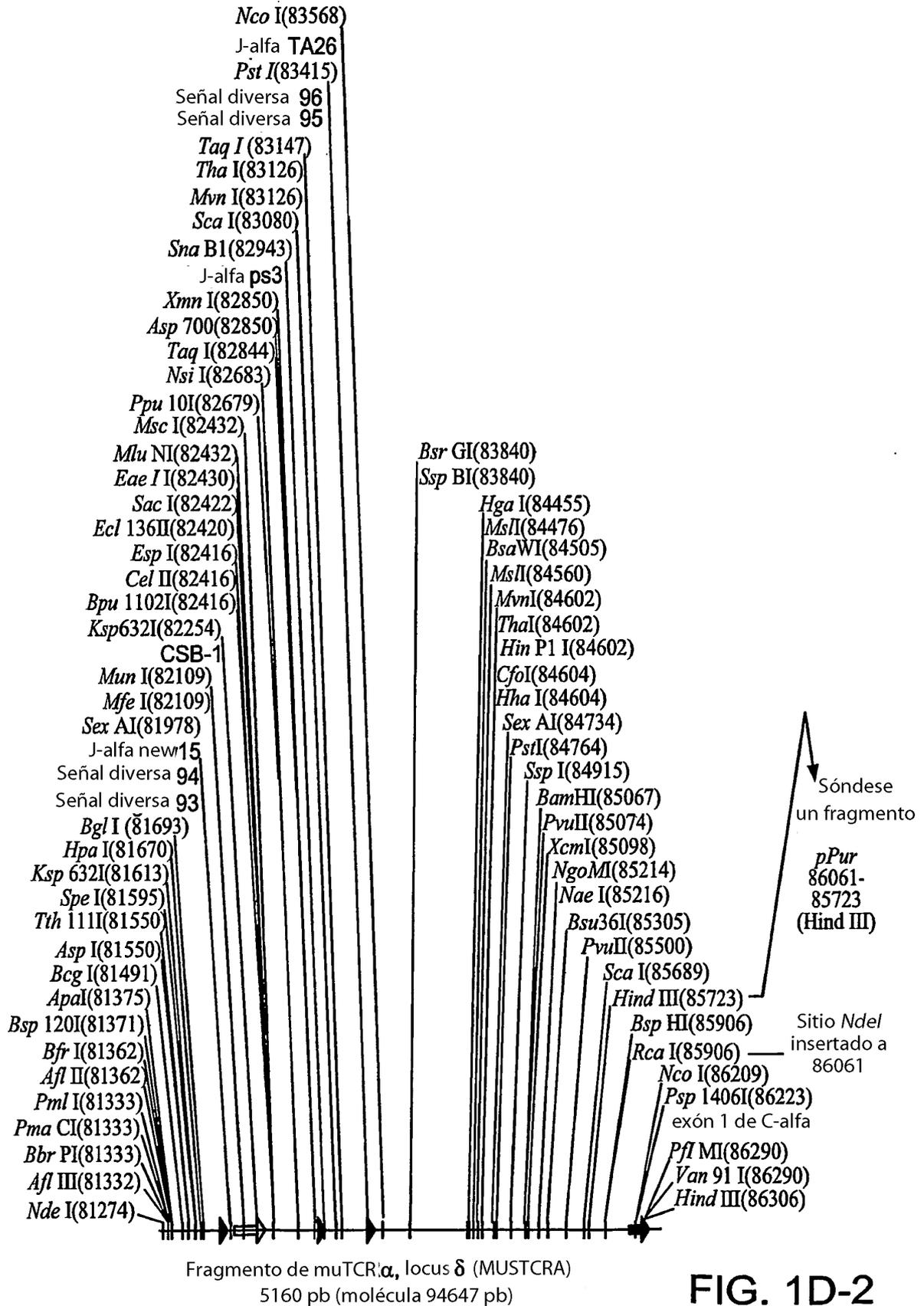


FIG. 1D-2

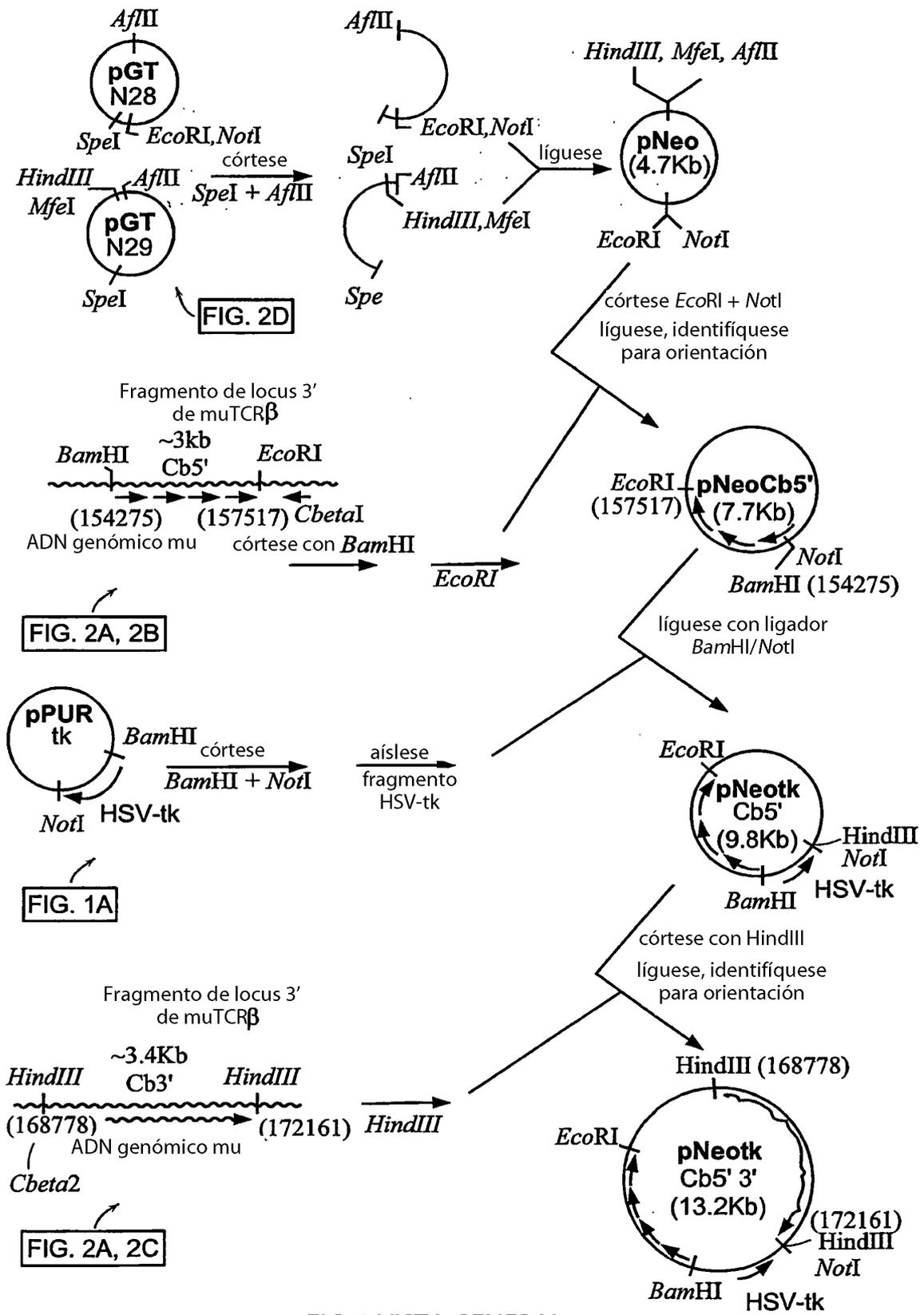


FIG. 2A

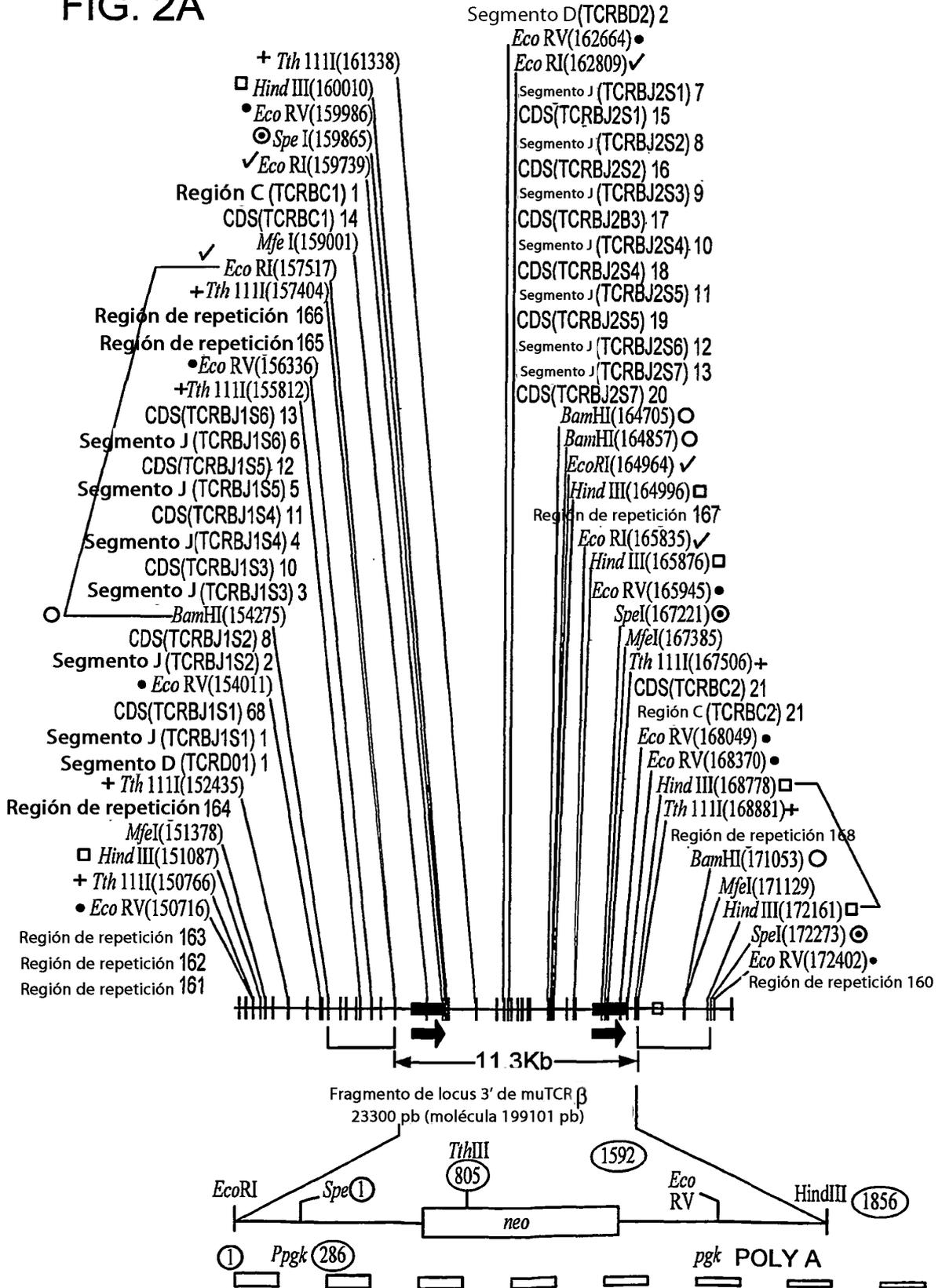
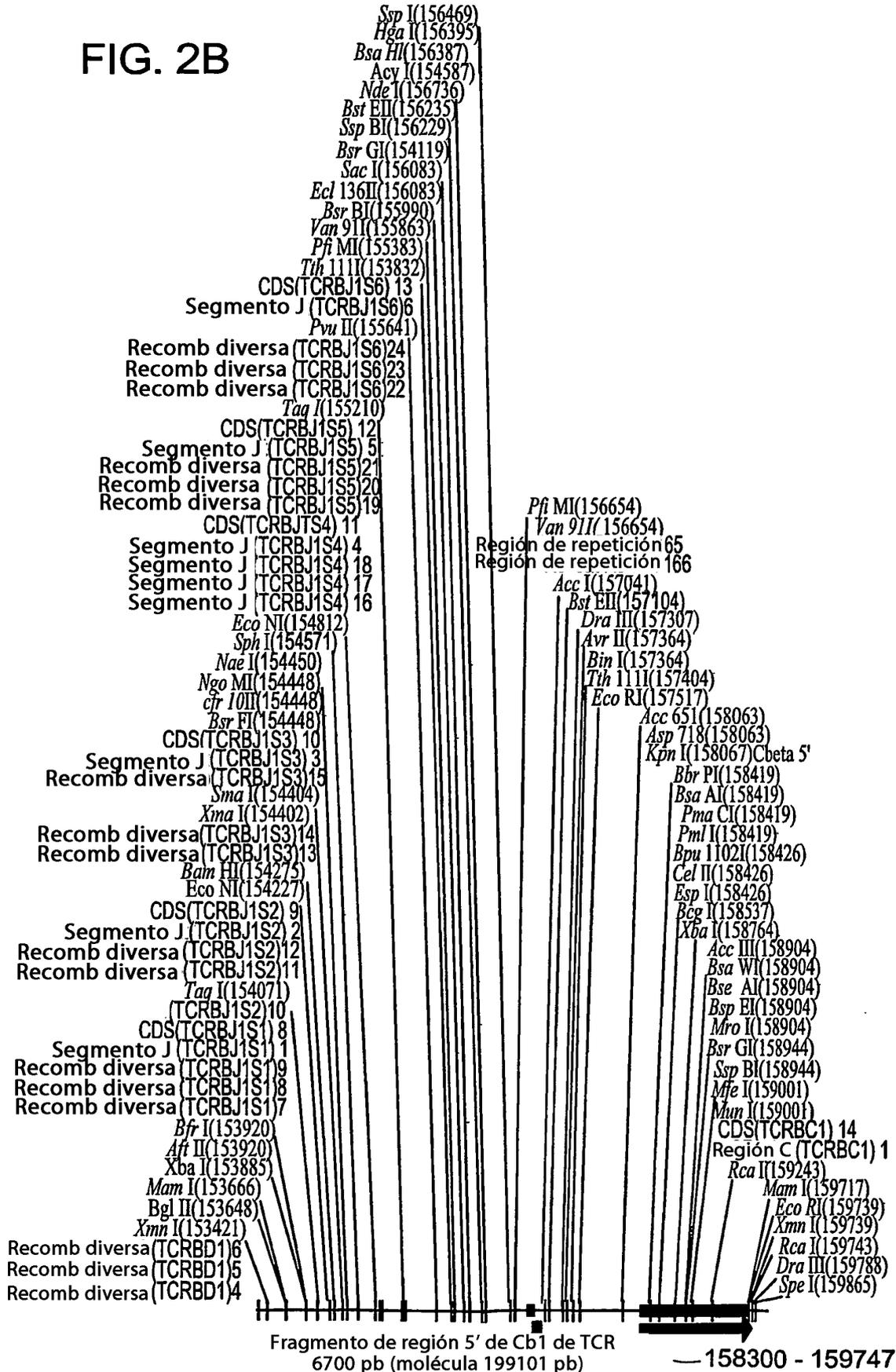


FIG. 2B



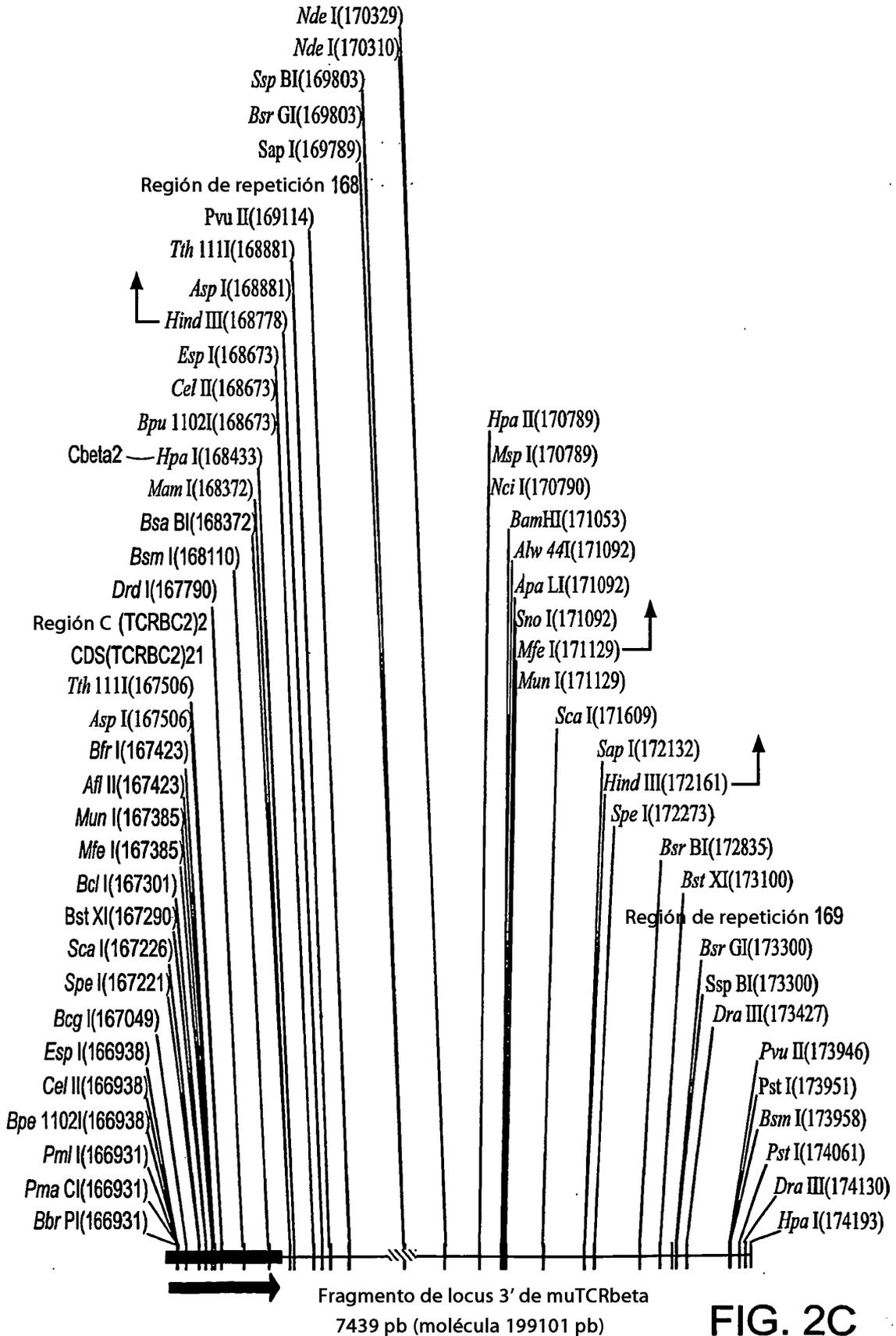


FIG. 2C

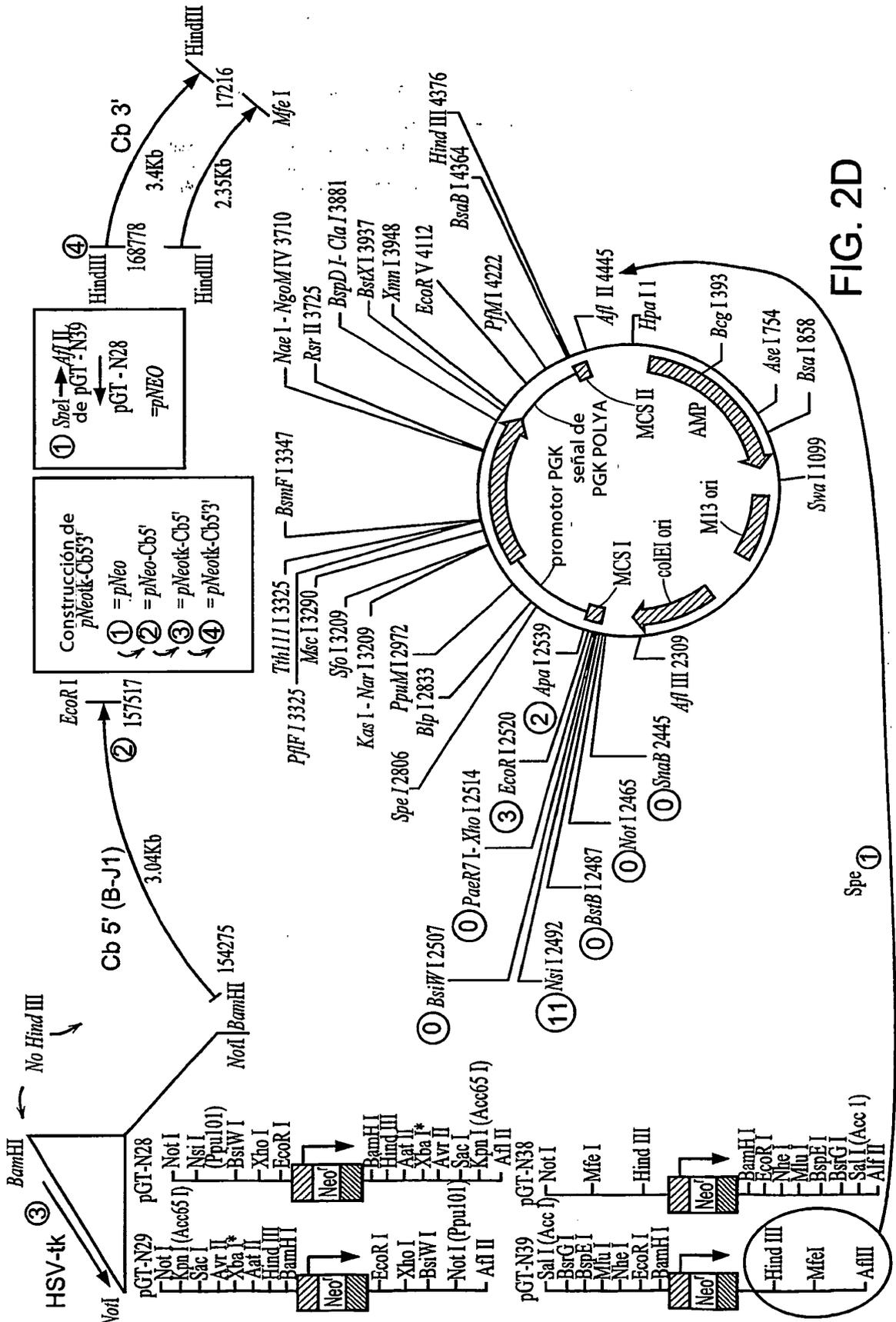


FIG. 2D

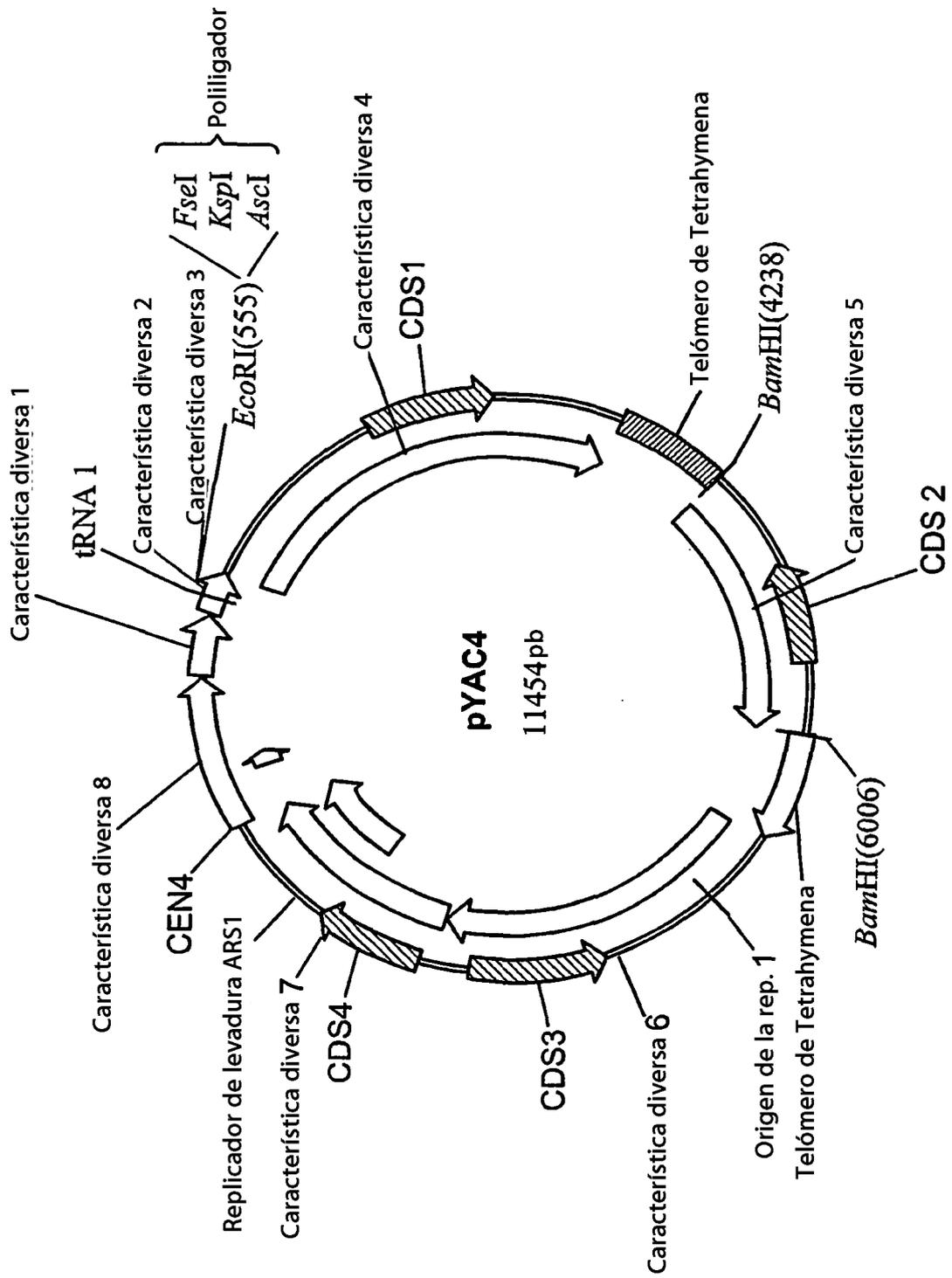


FIG. 3

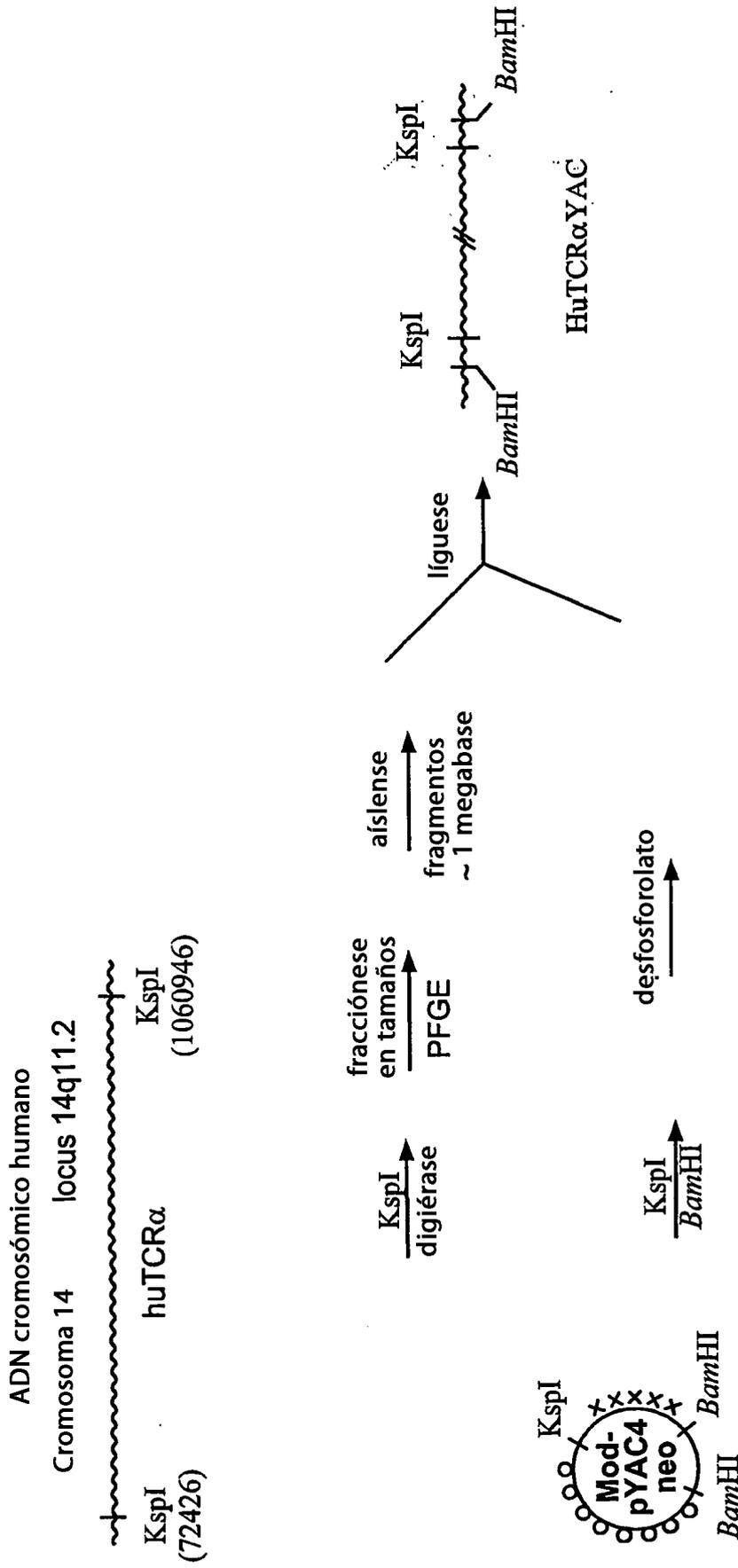


FIG. 4 VISTA GENERAL

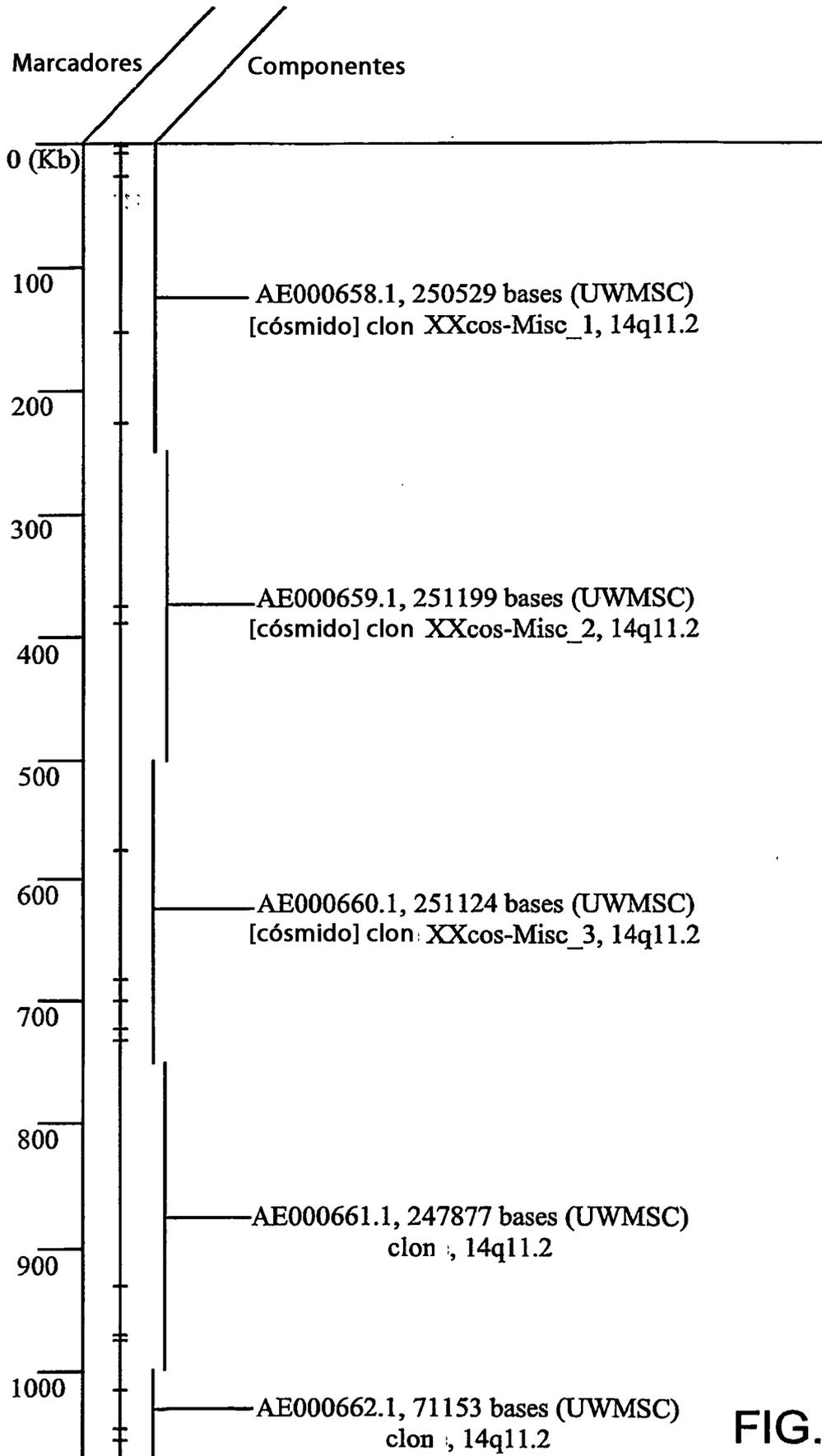
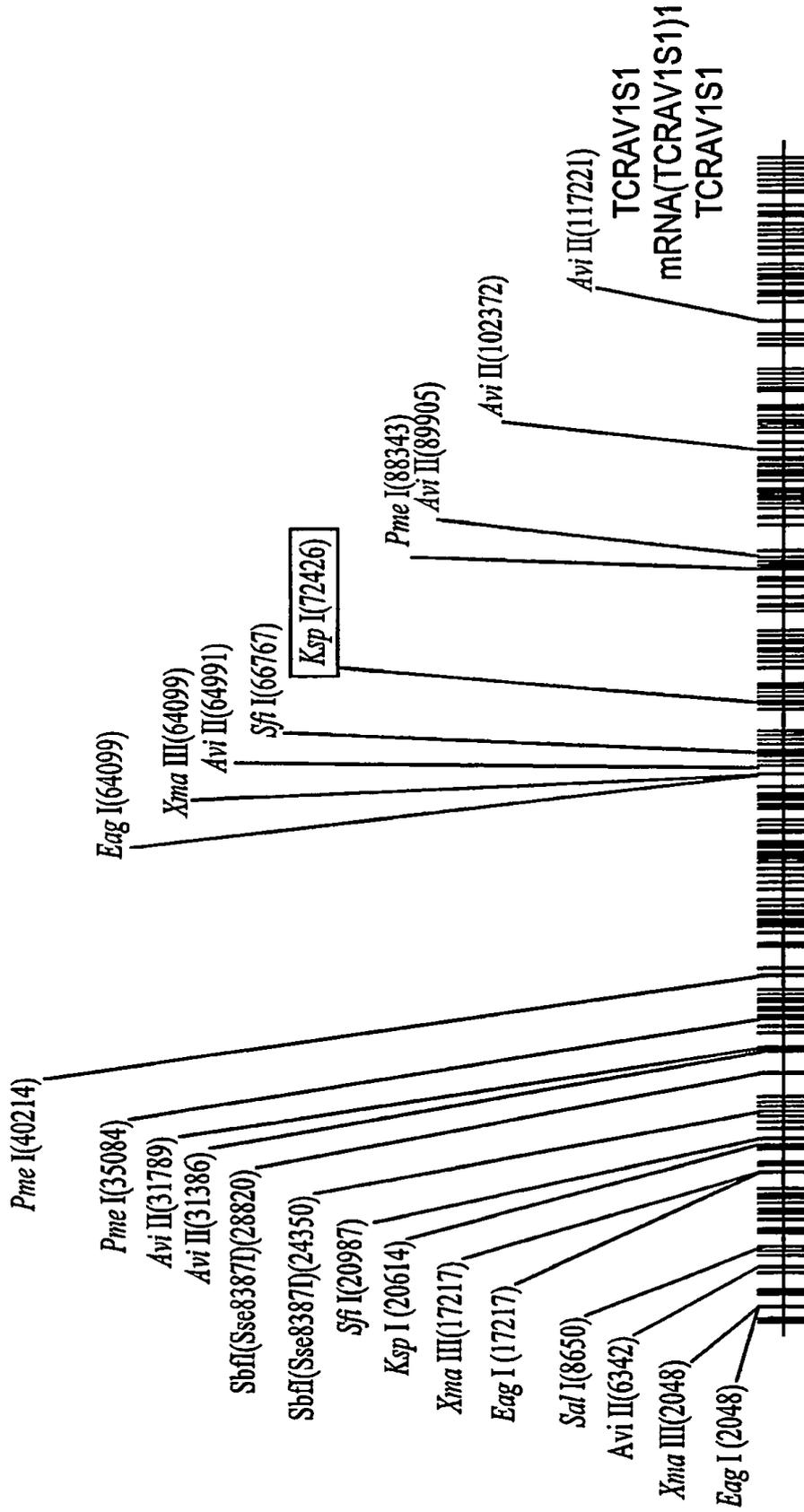


FIG. 4A



Fragmento de HAUE000658

137784 pb (molécula 250529 pb)

FIG. 4B

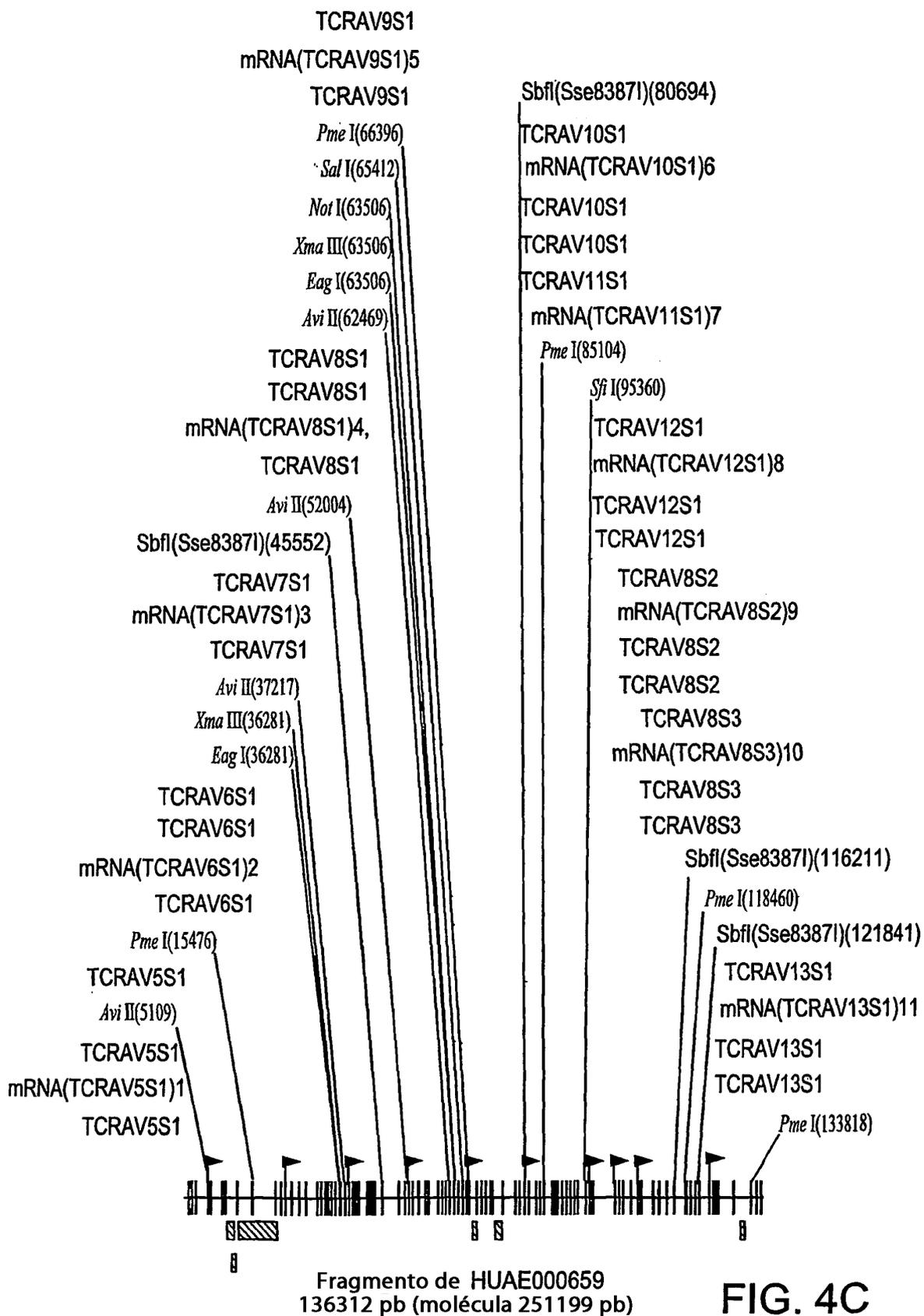
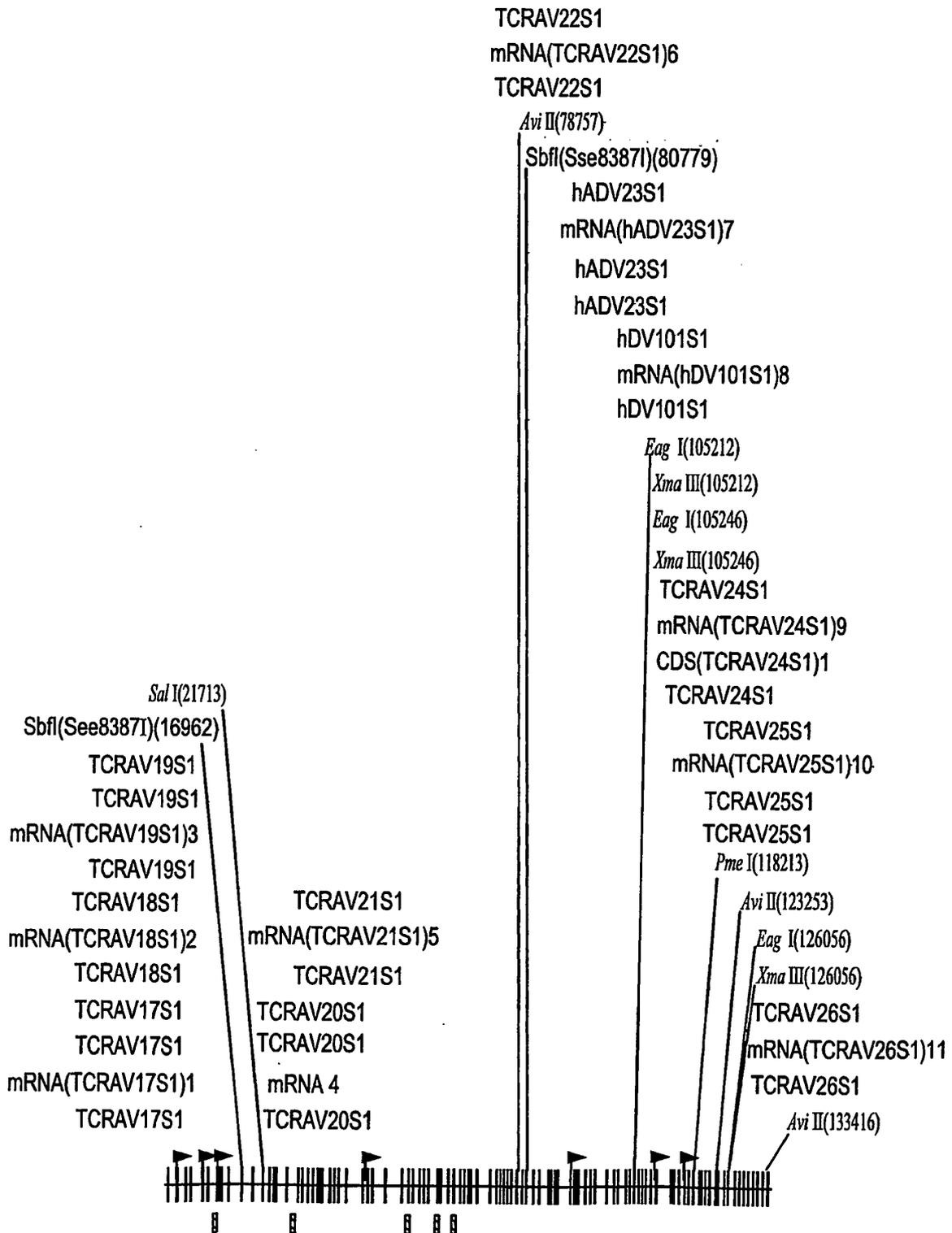


FIG. 4C



Fragmento de HUAE000660
134892 pb (molécula 251124 pb)

FIG. 4D

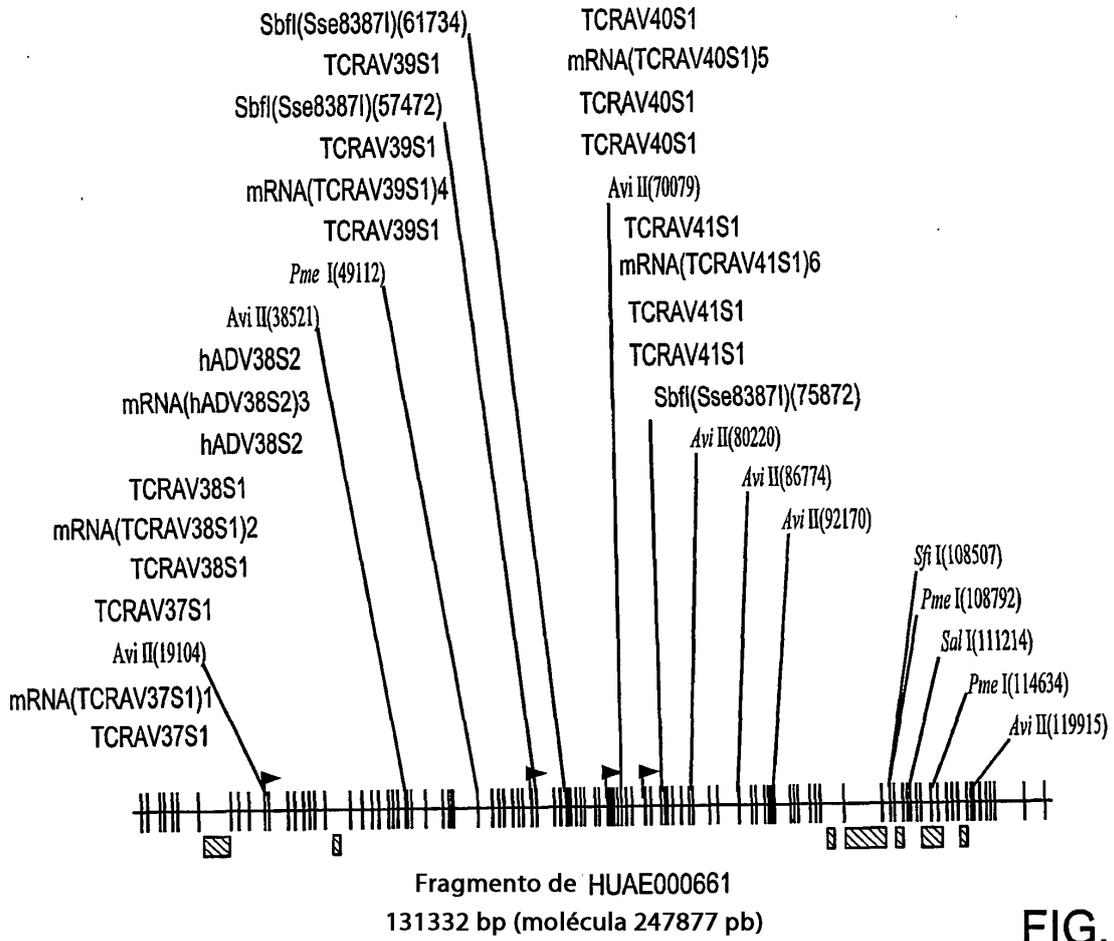
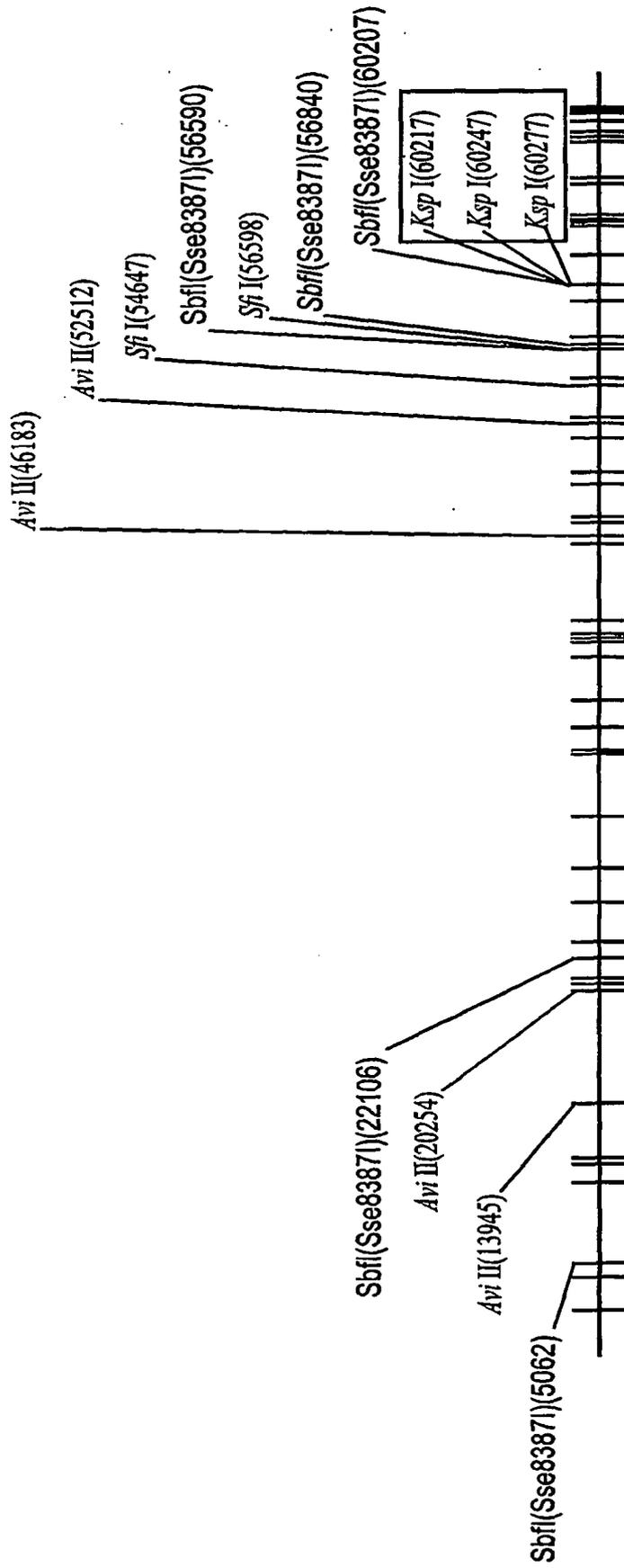


FIG. 4E



HUAE000662
71153 pb

FIG. 4F

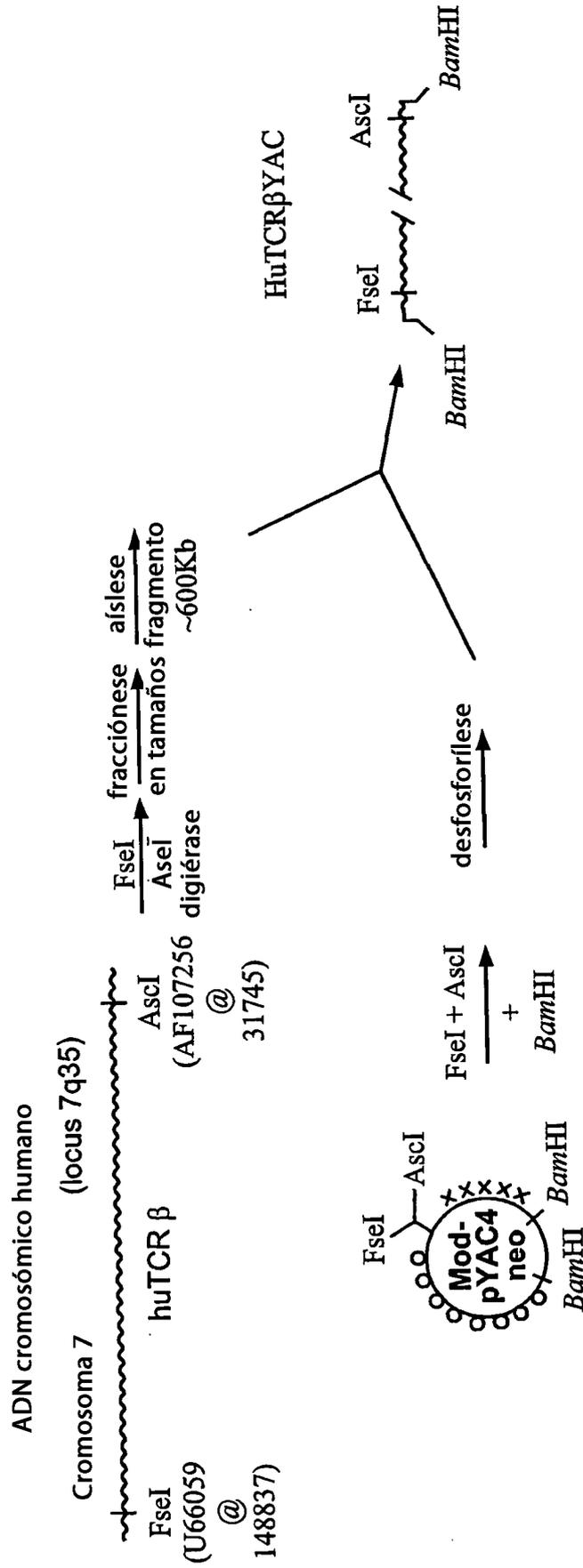
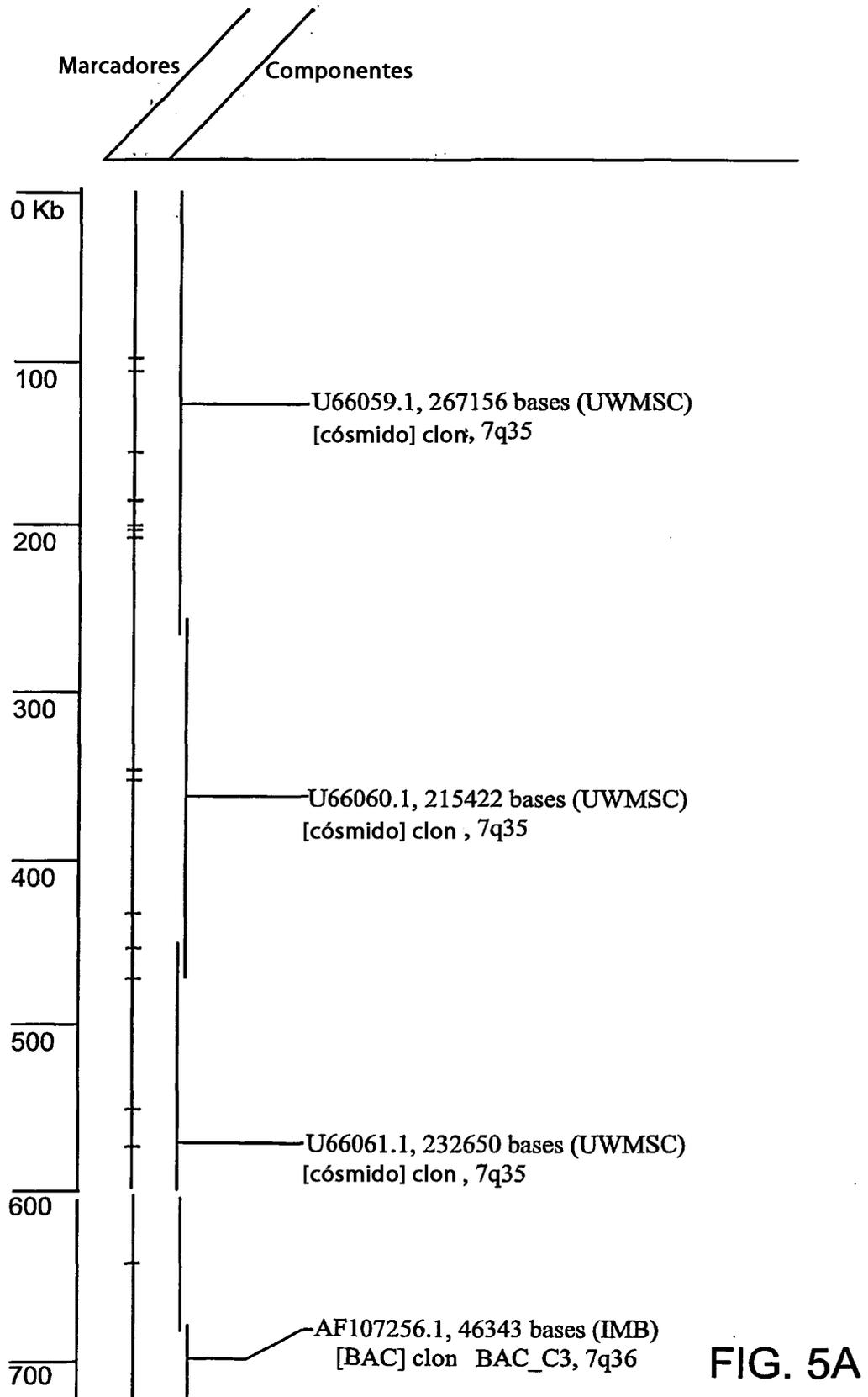


FIG. 5 VISTA GENERAL



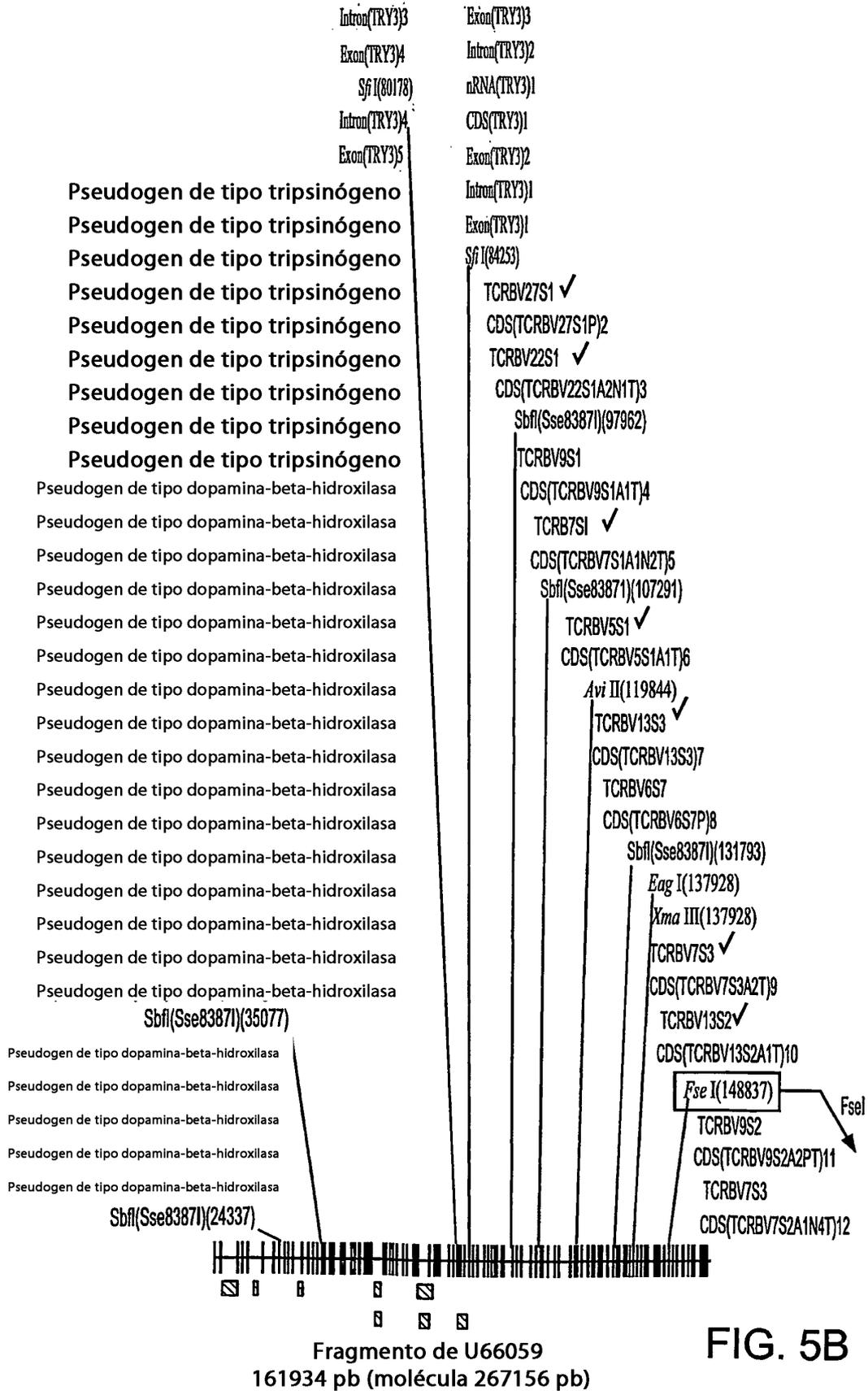


FIG. 5B

FIG. 5C

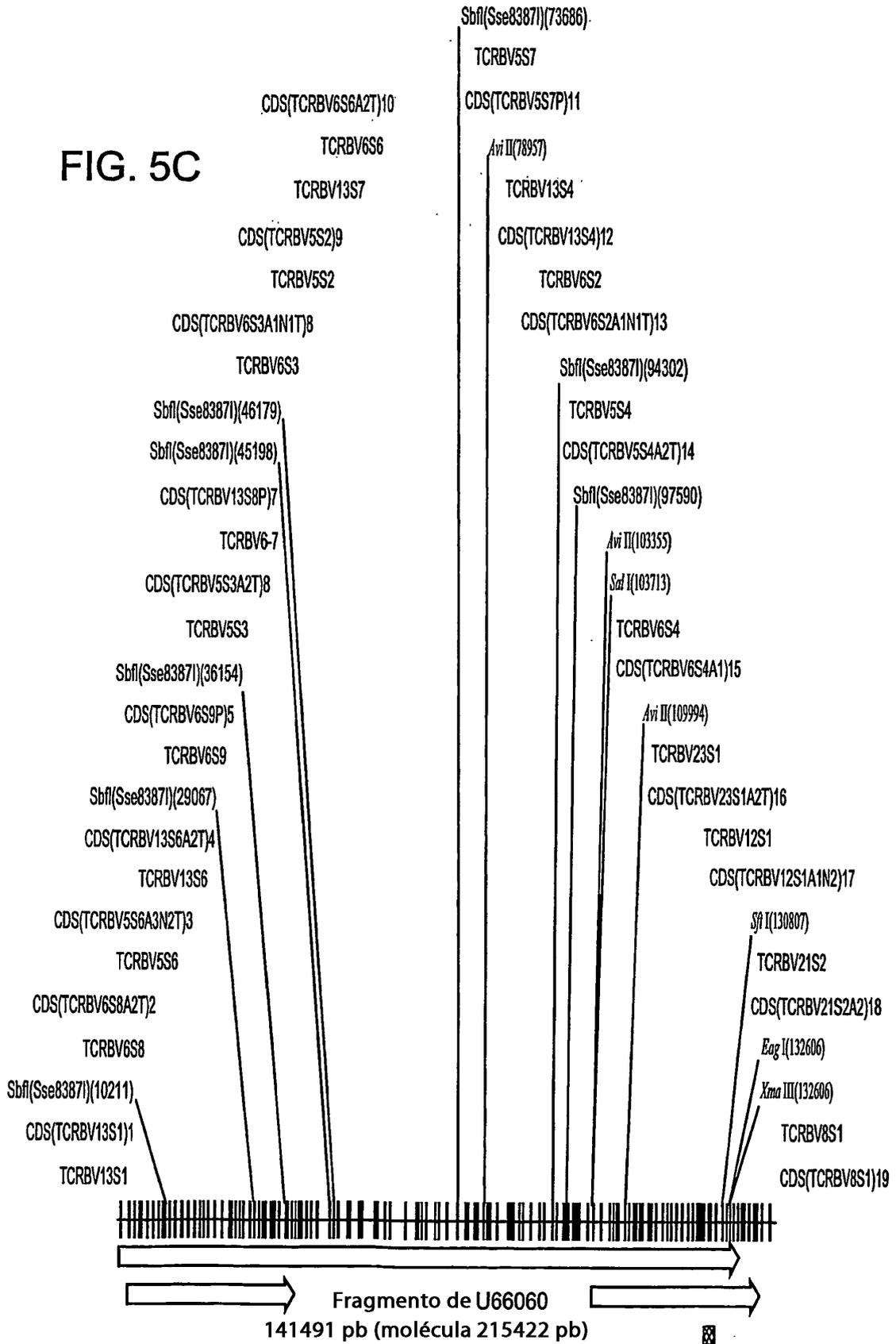
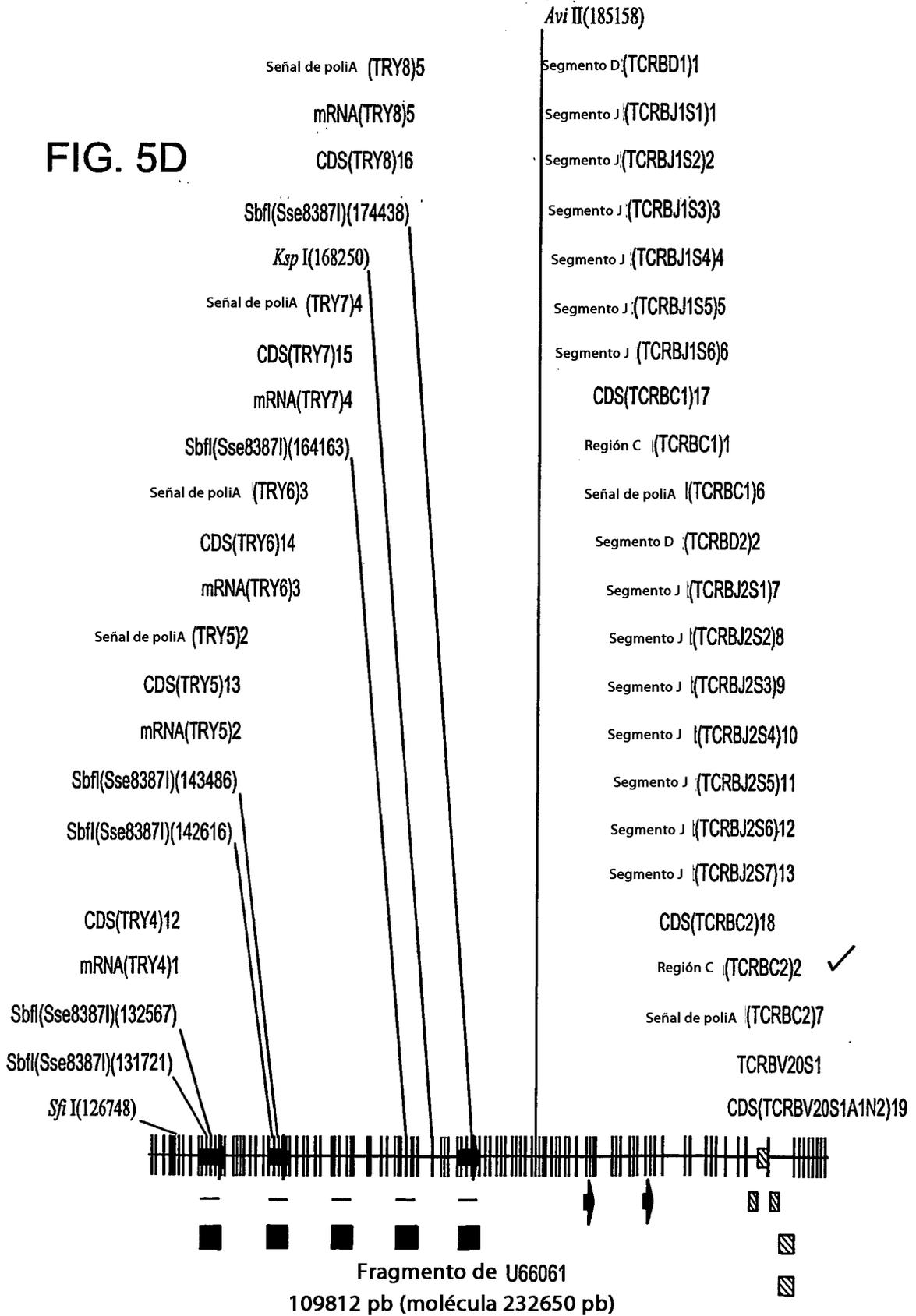
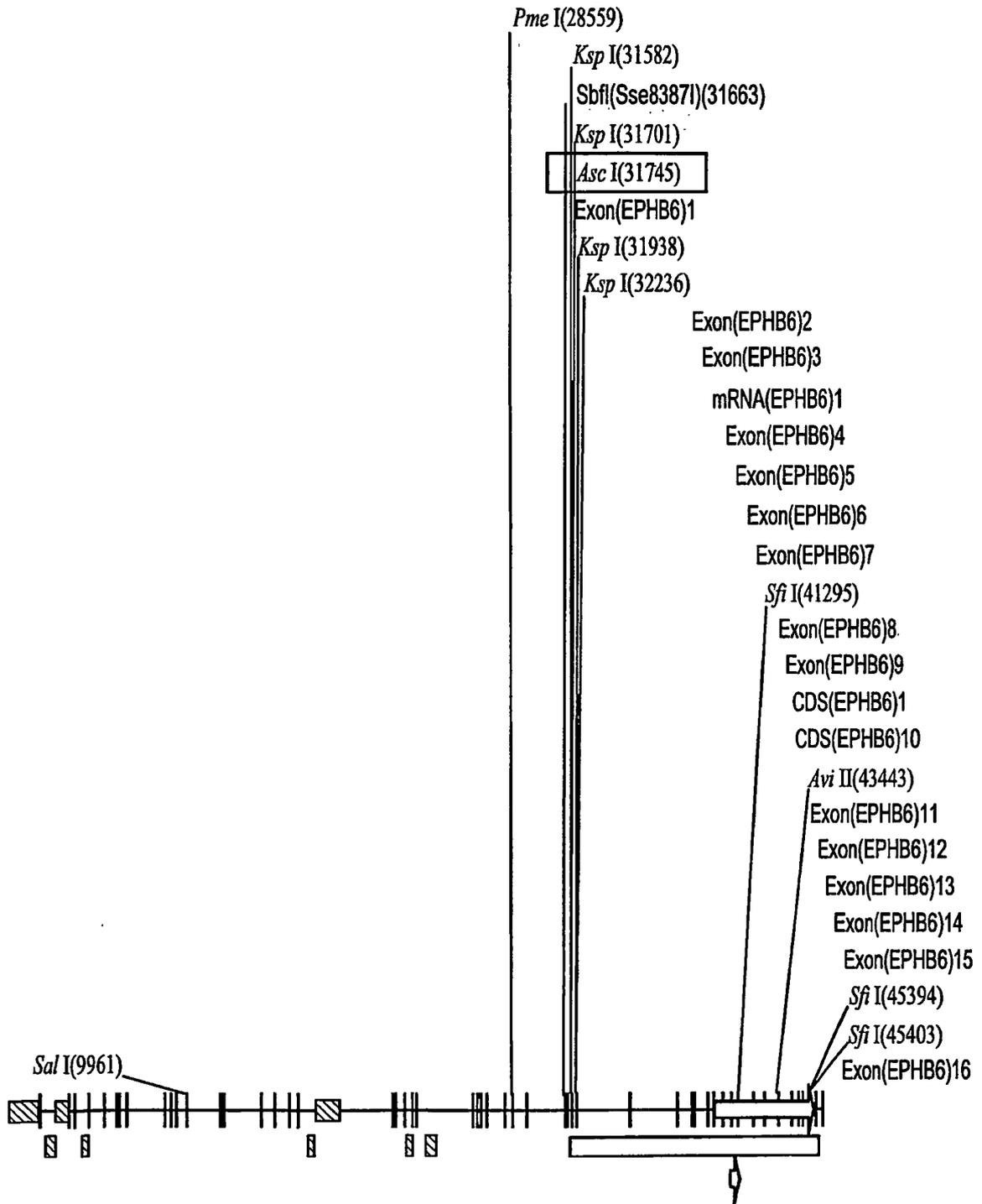


FIG. 5D





AF107256
46343 pb

FIG. 5E

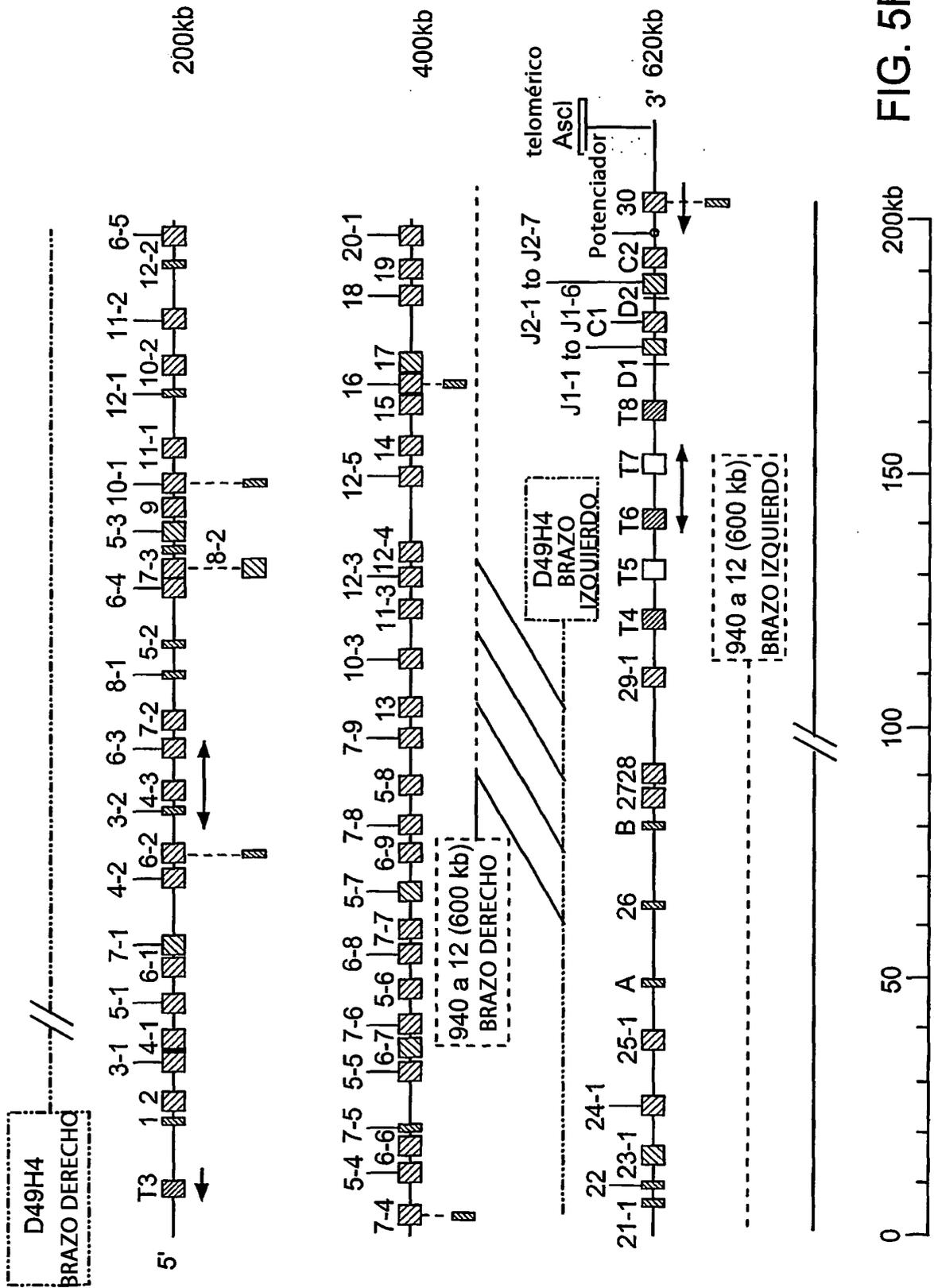


FIG. 5F

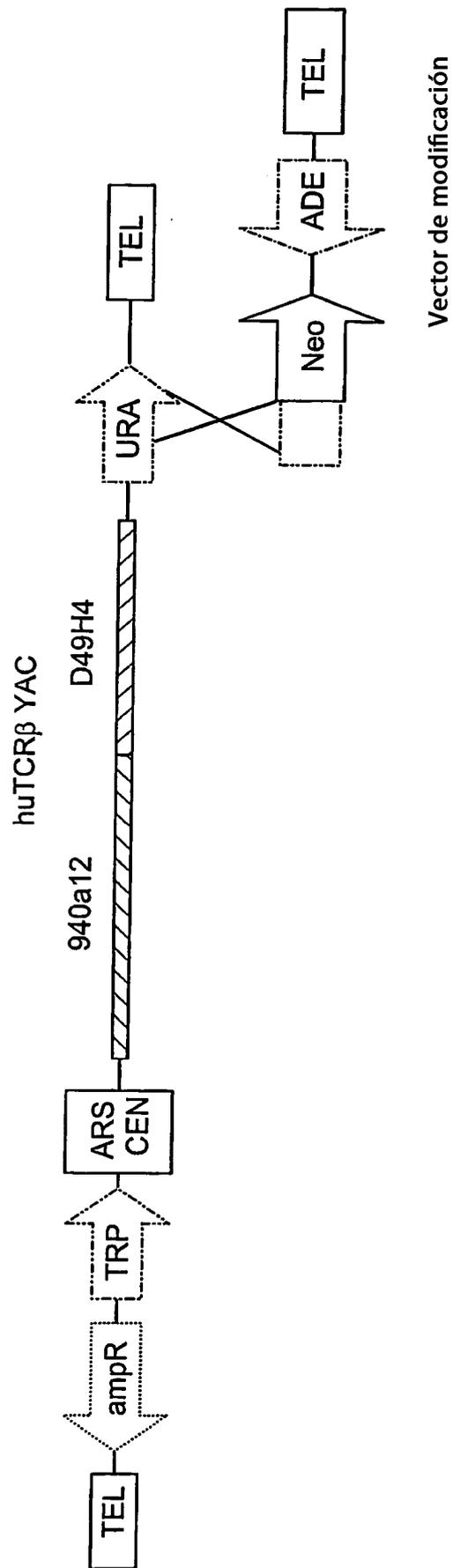
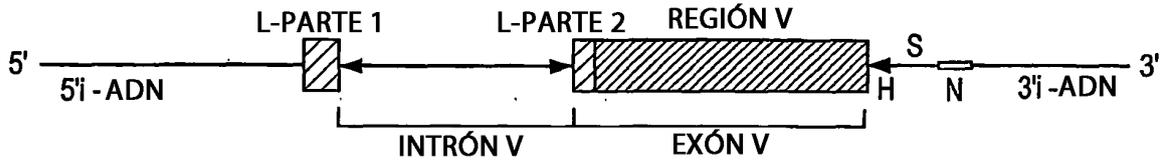
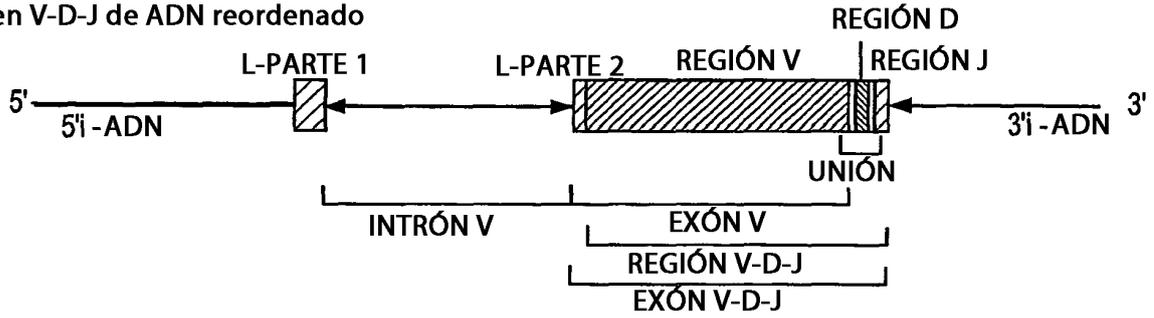


FIG. 5G

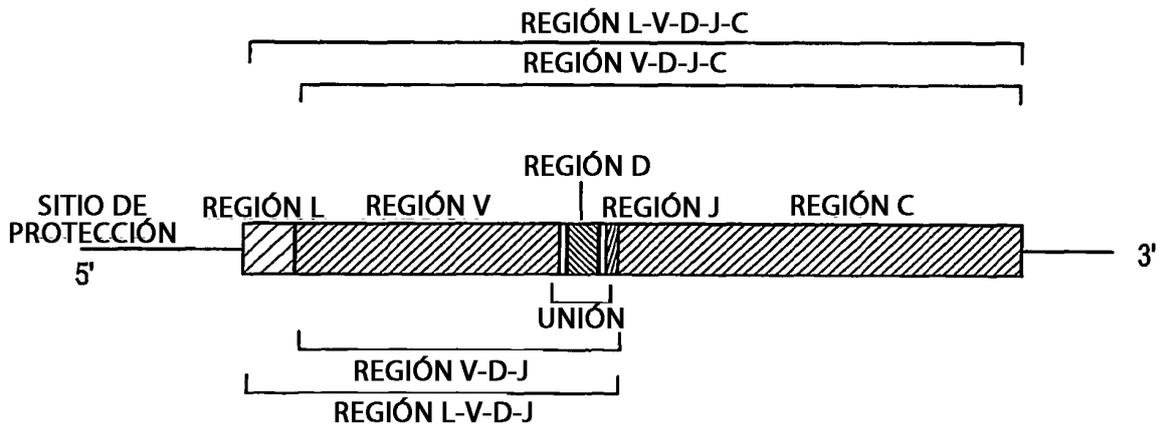
Gen V de línea germinal



Gen V-D-J de ADN reordenado



Secuencia de ADNc



Leyenda

- Ajuste aceptor o ajuste donante
- ▬ heptámero
- ▬ nomámero
- espaciador
- o
- ▭ regiones N

FIG. 6