

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 826**

51 Int. Cl.:

C12N 15/13 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **11161775 .9**

96 Fecha de presentación: **30.05.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2336329**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.06.2011**

54 Título: **Composiciones y métodos para inhibir genes endógenos de inmunoglobulinas y producir anticuerpos transgénicos de idiotipo humano**

30 Prioridad:

01.06.2007 US 914619 P

11.04.2008 US 44324 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

28.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

28.12.2012

73 Titular/es:

OMT, INC. (100.0%)
2724 Ross Road
Palo Alto, CA 94303, US

72 Inventor/es:

BUELOW, RONALD

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 393 826 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

Composiciones y métodos para inhibir genes endógenos de inmunoglobulinas y producir anticuerpos transgénicos de idiotipo humano

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a animales transgénicos que tienen uno o más loci endógenos de inmunoglobulinas inactivados, y a métodos para producir los mismos. La invención se refiere, además, a composiciones y a métodos de producción de anticuerpos humanizados y totalmente humanos utilizando tales animales transgénicos, y a anticuerpos producidos de este modo.

Antecedentes de la invención

- 10 Los anticuerpos son una clase importante de productos farmacéuticos que han sido empleados con éxito en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos humanos, que incluyen enfermedades infecciosas, cáncer, enfermedades alérgicas, y el síndrome del injerto frente al huésped, así como también para prevenir el rechazo de los trasplantes.

- 15 Un problema asociado con la aplicación terapéutica de inmunoglobulinas no humanas es la inmunogenicidad potencial de las mismas en pacientes humanos. Con objeto de reducir la inmunogenicidad de tales preparados han sido desarrolladas diversas estrategias para la producción de anticuerpos parcialmente humanos (humanizados) y totalmente humanos. La capacidad de producir anticuerpos transgénicos que poseen un idiotipo humano en animales, es particularmente deseable, dado que dentro de la región del idiotipo están situados determinantes antigénicos de unión, y se piensa que los idiotipos no humanos contribuyen a la inmunogenicidad de los compuestos terapéuticos actuales del tipo de anticuerpos. El idiotipo humano es una consideración especialmente importante con respecto a compuestos terapéuticos del tipo de los anticuerpos monoclonales, que consisten en un único idiotipo liberado en una concentración relativamente alta en oposición a la diversidad de idiotipos liberados en concentraciones más bajas por una mezcla de anticuerpos policlonales.

- 20 Aun cuando se han descrito muchos enfoques para producir anticuerpos transgénicos humanizados en animales, uno de los principales problemas encontrados en muchos de tales enfoques es la producción de anticuerpos endógenos, o bien preferentemente, o bien en combinación con anticuerpos transgénicos del animal hospedador. Se han utilizado diversos esquemas de clonación recombinante con el intento de interrumpir la producción de inmunoglobulinas endógenas en animales hospedadores para tratar este problema. Sin embargo, la inactivación funcional de genes de inmunoglobulinas presenta muchos obstáculos en muchas especies de vertebrados.

- 25 Por ejemplo, aun cuando han sido producidos con éxito ratones mutantes homocigóticos con loci JH suprimidos, usando recombinación homóloga, no se puede disponer con facilidad de células ES u otras células pluripotentes sustentables procedentes de la mayor parte de los vertebrados, en las que pudiera llevarse a cabo recombinación homóloga para inactivar loci endógenos.

- 30 Además, las mutaciones que interfieren con la expresión de la superficie celular pero no con la reordenación productiva de segmentos de genes VDJ ó VJ de inmunoglobulinas, son insuficientes para inactivar completamente la expresión endógena de inmunoglobulinas. Esto es puesto de ejemplo por el hecho de que los ratones mutantes homocigóticos con un exón membranal roto de la cadena pesada μ (denominados también ratones μ MT) no pueden producir IgM ni IgG, pero producen todavía cantidades importantes de IgA (Macpehrson et al., Nature Immunol 2(7):625-631 (2001). Además, el suero de ratones mutantes heterocigóticos contiene IgM e IgG codificadas por ambos alelos, el alelo de tipo salvaje y el alelo de μ MT mutado, ambos (Kitamura y Rajewky, Nature 356: 154-156 (1992). Esto es debido al hecho de que la primera reordenación durante el transcurso del desarrollo de células B, es la unión de los segmentos de genes DH y JH sobre ambos cromosomas homólogos, lo que genera una pro-célula B. Si, en los ratones μ MT/+, una pro-célula B sufre la unión subsiguiente de VH-DHJH en el locus de IgH mutado y la unión está en el marco de lectura ("productivo"), la pre-célula B que resulta puede expresar una cadena μ de la forma secretada, pero no puede expresar μ unida a la membrana. Puesto que se requiere la expresión de μ unida a la membrana para la exclusión alélica, una célula tal es capaz todavía de soportar la unión de VH-DHJH en el locus de IgH del tipo salvaje, y si esta segunda reordenación también es productiva, la célula expresa dos cadenas μ diferentes, una de las cuales está unida a la membrana. El suero de tales ratones contiene IgM derivada desde ambos alelos. Además, IgG derivada desde ambos alelos puede encontrarse en el suero de tales ratones debido a que, con frecuencia, es inducido simultáneamente un cambio en ambos loci de IgH de una célula B.

- 35 También se observa una exclusión alélica incompleta en animales con loci funcionales de inmunoglobulinas transgénicas y loci endógenos mutados de inmunoglobulinas, que todavía pueden reordenar productivamente segmentos de genes VDJ o VJ. Una célula B que reordene VH-DHJH en uno o ambos loci endógenos mutados todavía puede reordenar todavía productivamente loci de inmunoglobulinas transgénicas. Tal célula B expresa una inmunoglobulina transgénica unida a la membrana y se desarrolla en una célula B madura. Durante el desarrollo de las células B el desarrollo de cambio de isotipo en el locus endógeno mutado puede dar por resultado una célula B que expresa una inmunoglobulina endógena. Por consiguiente, tales mutaciones son insuficientes para la

inactivación completa de la expresión de inmunoglobulinas endógenas en animales con loci de inmunoglobulinas transgénicas.

5 Gorman et al (1991, Reshaping a therapeutic CD4 antibody PNAS, 88) describen un anticuerpo de rata inmunosupresor (compath-9) contra CD4 humana, que había sido reordenado para usar en la gestión de autoinmunidad y la prevención del rechazo de injertos.

Sumario de la invención

10 Un problema importante asociado con la producción de anticuerpos transgénicos humanizados en animales ha sido la producción o coproducción preferente de anticuerpos endógenos en el hospedador. La presente invención resuelve el problema proporcionando animales transgénicos que albergan al menos un locus artificial de Ig y que carecen de la capacidad de producir inmunoglobulinas endógenas.. Estos animales son sumamente útiles para producir anticuerpos transgénicos humanizados y totalmente humanos. Los métodos utilizados para generar tales animales transgénicos son eficaces en muchas especies, que incluyen especies desde las que células ES o células pluripotentes sustentables no pueden obtenerse con facilidad actualmente y en las que no se llevan a cabo fácilmente ni recombinación homóloga ni alteraciones de genes.

15 La presente invención resulta, en parte, del descubrimiento de que puede usarse una meganucleasa para escindir funcionalmente loci endógenos de inmunoglobulinas para generar animales transgénicos útiles para producir anticuerpos transgénicos humanizados y totalmente humanos. Además, pueden usarse dos meganucleasas distintas que hacen blanco en sitios genómicos distintos, para suprimir eficazmente una parte grande de un locus de inmunoglobulina (hasta varios kb), asegurando con ello la inactivación completa del locus y asegurando, además, 20 que los animales transgénicos portadores de la mutación de la línea germinal no generan células B capaces de producir inmunoglobulinas endógenas.

En un aspecto, la invención proporciona un método de generación de una rata, que comprende:

- 25 (A) inyectar en una célula germinal de rata, oocito de rata fertilizado o un embrión de rata, una meganucleasa específica de fragmentos génicos de Ig en loci de cadenas pesadas y/o de cadenas ligeras, endógenos a la rata, en el que la meganucleasa introduce roturas de dobles cadenas en dichos loci de cadenas pesadas y/o de cadenas ligeras, o
- 30 (B) inyectar en una célula germinal de rata, oocito de rata fertilizado o un embrión de rata, un vector de expresión o ácido nucleico que codifica una meganucleasa específica para fragmentos génicos de Ig en loci de cadenas pesadas y/o cadenas ligeras, endógenos a la rata, en el que la meganucleasa introduce roturas de dobles cadenas en dichos loci de cadenas pesadas y/o cadenas ligeras.

En un segundo aspecto, la invención proporciona una rata que es nulicigótica para loci endógenos de cadenas ligeras de Ig y/o loci endógenos de cadenas pesadas.

35 En un tercer aspecto, la invención proporciona un método para producir un anticuerpo monoclonal, que comprende: (i) inmunizar con un inmunógeno una rata de la invención; (ii) aislar desde la rata una célula que produce anticuerpos monoclonales, en el que la célula que produce anticuerpos monoclonales produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno; y (iii) utilizar la célula productora de anticuerpos monoclonales para producir el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno, o utilizar la célula que produce anticuerpos monoclonales para producir una célula de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal y usar la célula de hibridoma para producir el anticuerpo monoclonal.

40 En un cuarto aspecto, la invención proporciona un método para producir un anticuerpo monoclonal, que comprende (i) inmunizar con un inmunógeno una rata de la invención; (ii) aislar desde la rata una célula que produce anticuerpos monoclonales, en el que la célula que produce anticuerpos monoclonales produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno; (iii) aislar desde la célula que produce anticuerpos monoclonales un ácido nucleico de anticuerpos monoclonales que codifica el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno; y (iv) usar el ácido nucleico de anticuerpos monoclonales para producir el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno, en el que, opcionalmente, el anticuerpo monoclonal posee un idiotipo humano.

45 En un quinto aspecto, la invención proporciona un método para producir un anticuerpo monoclonal, que comprende: 50 (i) inmunizar con un inmunógeno una rata de la invención; (ii) aislar desde la rata una célula que produce anticuerpos monoclonales en la que la célula que produce anticuerpos monoclonales produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno; (iii) aislar desde la célula que produce anticuerpos monoclonales un ácido nucleico de anticuerpos monoclonales que codifica el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno; (iv) modificar el ácido nucleico de anticuerpos monoclonales para producir un ácido nucleico recombinante que codifica un anticuerpo monoclonal totalmente humano; y (v) usar el ácido nucleico recombinante que codifica un anticuerpo monoclonal totalmente humano para producir el anticuerpo monoclonal totalmente humano codificado.

En un sexto aspecto, la invención proporciona una célula que puede obtenerse por el método de la invención.

En un séptimo aspecto, la invención proporciona una célula transfectada que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo monoclonal de la invención.

5 En un octavo aspecto, la invención proporciona la célula transfectada que comprende un ácido nucleico monoclonal que codifica el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno, según se ha definido antes.

10 En un noveno aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo monoclonal que puede obtenerse por un método de la invención, en el que el locus artificial comprende al menos un segmento de gen J humano, en el que el anticuerpo monoclonal es una inmunoglobulina quimérica que comprende una parte de una secuencia polipeptídica de inmunoglobulina humana y una parte de una secuencia polipeptídica de inmunoglobulina de la rata.

En un décimo aspecto, la invención proporciona una inmunoglobulina quimérica que comprende una secuencia polipeptídica codificada por un ácido nucleico de la invención, en el que la inmunoglobulina quimérica comprende una parte de una secuencia polipeptídica de inmunoglobulina humana y una parte de una secuencia polipeptídica de inmunoglobulina de la rata.

15 En un undécimo aspecto, la invención proporciona una célula transfectada que comprende el ácido nucleico de la invención.

20 Por consiguiente, la invención proporciona animales transgénicos que comprenden al menos un locus artificial de Ig y que tienen al menos un locus endógeno de Ig inactivado, de línea germinal. Los animales utilizados en la invención son animales pequeños de laboratorio, en particular aves, roedores y comadrejas. Los loci artificiales utilizados en la invención comprenden al menos un segmento de gen V humano. En una realización preferida un locus artificial de Ig comprende: (i) una región V que posee al menos un segmento de gen V humano que codifica una línea germinal o una secuencia de aminoácidos de región V humana hipermutada; (ii) uno o más segmentos de gen J; y (iii) uno o más genes de región constante, en los que el locus artificial de Ig es funcional y capaz de experimentar reordenación génica y producir una colección de inmunoglobulinas en el animal transgénico.

25 En una realización, el animal transgénico comprende un locus endógeno de cadena pesada de Ig inactivado. En una realización preferida el animal transgénico tiene inactivados ambos loci endógenos de cadena pesada de Ig y, por tanto, no es portador de un locus endógeno funcional de cadena pesada de Ig .

30 En una realización, el animal transgénico comprende un locus endógeno de cadena ligera de Ig inactivado. En una realización preferida el animal transgénico tiene inactivados ambos loci endógenos de cadena ligera de Ig y, por tanto, no es portador de un locus endógeno funcional de cadena ligera de Ig.

En una realización preferida, el animal transgénico carece de un locus endógeno funcional de cadena pesada de Ig y un locus funcional de cadena ligera de Ig.

35 En una realización, el animal transgénico comprende al menos un locus artificial de cadena pesada de Ig. En una realización, el animal transgénico carece de un locus funcional de cadena ligera de Ig y comprende al menos un locus artificial de cadena pesada de Ig.

En una realización, el animal transgénico comprende al menos un locus artificial de cadena ligera de Ig.

En una realización el animal transgénico comprende al menos un locus artificial de cadena pesada de Ig y al menos un locus artificial de cadena ligera de Ig.

40 En una realización preferida, los loci artificiales de Ig son funcionales y capaces de soportar reordenación génica y producir una colección de inmunoglobulinas en el animal transgénico, cuya colección de inmunoglobulinas incluye inmunoglobulinas que poseen un idiotipo humano.

45 En una realización, uno o más genes de región constante de los loci artificiales de Ig, comprenden al menos un gen de región constante no humano y son funcionales y capaces de soportar reordenación génica y producir una colección de inmunoglobulinas quiméricas en el animal transgénico, cuya colección de inmunoglobulinas quiméricas incluye inmunoglobulinas quiméricas que poseen un idiotipo humano.

En una realización, uno o más genes de región constante de los loci artificiales de Ig comprenden al menos un gen de región constante humana y son funcionales y capaces de soportar reordenación génica y producir una colección de inmunoglobulinas en el animal transgénico, cuya colección de inmunoglobulinas incluye inmunoglobulinas que poseen un idiotipo humano y una región constante humana.

50 La invención comprende animales transgénicos capaces de generar células germinales viables que tienen al menos un locus endógeno de Ig que está inactivado.

En una realización, tales animales transgénicos comprenden una construcción de expresión de meganucleasa genómica, preferiblemente una construcción que tiene una región de control de la expresión inducible ligada de modo operable a un ácido nucleico que codifica meganucleasas, en la que la meganucleasa codificada reconoce una secuencia diana de meganucleasas presente en, o proximal a, un locus endógeno de Ig del animal transgénico.

- 5 Cuando el animal transgénico está maduro sexualmente y comprende células germinales viables, y la construcción de expresión de meganucleasa genómica, puede usarse para inactivar el locus endógeno de Ig seleccionado como blanco, in vitro o in vivo, sin comprometer su viabilidad, asegurando que pueden desviarse desde ahí animales F1 que llevan una mutación de la línea germinal en un locus de Ig.

En una realización, el animal transgénico comprende, además, al menos un locus artificial de Ig.

- 10 La invención incluye animales transgénicos que comprenden células germinales viables en las que al menos un locus endógeno de Ig está inactivado. En una realización el animal transgénico comprende, además, al menos un locus artificial de Ig.

En una realización, la invención proporciona métodos para producir animales transgénicos que comprenden al menos un locus artificial de Ig y que poseen al menos un locus endógeno de Ig inactivado, de la línea germinal. En una realización preferida el animal transgénico es nulicigótico para cadenas ligeras de Ig endógena y/o cadenas pesadas de Ig endógena.

- 15 Preferiblemente, un locus endógeno de Ig es inactivado en una célula germinal parental, o en la célula germinal de un predecesor, por expresión de una meganucleasa en él. Los métodos comprenden producir una meganucleasa en la célula germinal, en los que la meganucleasa reconoce una secuencia diana de meganucleasas presente en, o proximal a, un locus endógeno de Ig, e inactiva selectivamente el locus de Ig de la célula germinal seleccionado como blanco, produciendo con ello una célula germinal viable que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado. Tal célula germinal que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado, se utiliza para producir un animal que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado, de línea germinal. En una realización, la célula germinal o aquella con la que está combinada, comprende al menos un locus artificial de cadena pesada de Ig. En una realización, la célula germinal, o aquella con la que esta combinada, comprende al menos un locus artificial de cadena ligera de Ig. En una realización, la célula germinal, o aquella con la que está combinada, comprende al menos un locus artificial de cadena ligera de Ig y al menos un locus artificial de cadena pesada de Ig.

En una realización, los métodos implican introducir en la célula germinal una construcción de expresión de meganucleasas o de un ácido nucleico que codifica una meganucleasa.

- 20 En una realización preferida, la célula germinal comprende una construcción genómica de expresión de meganucleasas, que comprende una región de control de la expresión ligada de modo operable a un ácido nucleico que codifica meganucleasas. En una realización preferida, la célula germinal comprende una construcción genómica inducible, de expresión de meganucleasas y los métodos implican inducir la expresión en la célula germinal del ácido nucleico que codifica meganucleasas. En una realización, los métodos implican repetir la etapa de inducción de la expresión en la célula germinal del ácido nucleico que codifica meganucleasas. En una realización, la inducción se lleva a cabo in vivo. En otra realización, la inducción se lleva a cabo in vitro. En una realización, la célula germinal comprende una construcción genómica de expresión de meganucleasas, que comprende una región de control de la expresión que manifiesta actividad específica de célula germinal.

- 25 Las células germinales que resultan pueden emplearse para generar un animal F1 que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado, de línea germinal. El animal F1 puede comprender uno o más loci artificiales de Ig o puede ser cruzado con objeto de generar tales animales que comprenden al menos un locus artificial de Ig.

- 30 En una realización alternativa, el método lleva consigo introducir una construcción de expresión de meganucleasa o de un ácido nucleico que codifica meganucleasas, en un oocito fertilizado o un embrión, y generar una célula germinal viable que tiene al menos un locus de Ig inactivado en el animal fundador que resulta. El animal fundador puede ser utilizado para generar un animal F1 que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado, de línea germinal. El animal F1 puede comprender uno o más loci artificiales de Ig o puede ser cruzado con objeto de generar animales tales que comprenden al menos un locus artificial de Ig.

En una realización, la secuencia diana de meganucleasas está presente en, o proximal a, un segmento de gen J .

- 35 En una realización, la secuencia diana de meganucleasas está presente en, o proximal a, un segmento génico de región constante de inmunoglobulina. En una realización preferida, el gen de región constante codifica una inmunoglobulina μ .

En una realización, los métodos implican la selección de células germinales por viabilidad y la inactivación de un locus endógeno de Ig. En una realización, los métodos implican la selección de células germinales por la presencia de un locus artificial de Ig.

En los métodos de esta invención, el cruzamiento de animales se lleva a cabo, preferiblemente, entre animales que tienen loci endógenos inactivados, para generar animales que son nulicigóticos para cadenas ligeras de Ig endógena y/o cadenas pesadas de Ig endógena.

5 En una realización preferida, los métodos comprenden, además, el uso de una segunda meganucleasa. La segunda meganucleasa reconoce una segunda secuencia diana de meganucleasas presente en, o proximal al, locus endógeno de Ig y escinde selectivamente el locus endógeno de Ig junto con la primera meganucleasa pero en un sitio diferente del de la primera meganucleasa, inactivando con ello al menos un locus endógeno de Ig

10 En una realización preferida, la célula germinal comprende una segunda construcción genómica de expresión de meganucleasa, que comprende una región de control de la expresión ligada de modo operable a un segundo ácido nucleico que codifica meganucleasas. En una realización preferida, la región de control de la expresión es una región de control de la expresión inducible, y el método comprende, además, inducir la expresión en la célula germinal del segundo ácido nucleico que codifica meganucleasas, con lo que es producida la segunda meganucleasa codificada y, junto con la primera meganucleasa, inactiva selectivamente el locus de Ig considerado como blanco, de la célula germinal. En una realización, los métodos implican repetir la etapa de inducir en la célula
15 germinal la expresión del segundo ácido nucleico que codifica meganucleasas. En una realización, la inducción se realiza in vivo. En una realización, la inducción se realiza in vitro. En una realización, la segunda construcción genómica de expresión de meganucleasa comprende una región de control de la expresión que manifiesta actividad específica de célula germinal.

20 En una realización alternativa, los métodos implican introducir en la célula germinal una segunda construcción de expresión de meganucleasa o de un segundo ácido nucleico que codifica meganucleasas,

25 En una realización alternativa, los métodos implican introducir en un oocito fertilizado o en un embrión una segunda construcción de expresión de meganucleasa o de un segundo ácido nucleico que codifica meganucleasas, y generar en el animal fundador que resulta, una célula germinal viable que posee al menos un locus de Ig inactivado. El animal fundador puede ser utilizado para generar un animal F1 que posee al menos un locus endógeno de Ig inactivado, de la línea germinal. El animal F1 puede comprender uno o más loci artificiales de Ig o puede ser cruzado con objeto de generar animales tales que comprenden al menos un locus artificial de Ig.

30 En una realización preferida, la primera y la segunda meganucleasas hacen blanco en segmentos de gen J. En una realización, la primera y la segunda meganucleasa hacen blanco en secuencias que están situadas, tomadas en conjunto, aguas arriba y aguas abajo de uno o más segmentos de gen J dentro del locus endógeno de Ig, y la escisión por la primera y segunda meganucleasa codificadas produce la supresión de un segmento de DNA genómico que comprende el uno o más segmentos de gen J.

35 En otra realización, la primera y segunda meganucleasas hacen blanco en segmentos génicos de región constante. En una realización, la primera y la segunda meganucleasa hacen blanco en secuencias que están situadas, tomadas en conjunto, aguas arriba y aguas abajo de uno o más segmentos génicos de región constante de inmunoglobulinas, y la escisión por la primera y la segunda meganucleasas codificadas produce la supresión de un segmento de DNA genómico que comprende el uno o más segmentos génicos de región constante de inmunoglobulinas. En una realización preferida, el gen de región constante codifica una inmunoglobulina μ .

40 En métodos de esta invención, los loci artificiales usados comprenden al menos un segmento de gen V humano. En una realización preferida, un locus artificial de Ig comprende (i) una región V que tiene al menos un segmento de gen V humano que codifica una línea germinal o una secuencia de aminoácidos de región V humana, hipermutada; (ii) uno o más segmentos de gen J; y (iii) uno o más genes de región constante, en los que el locus artificial de Ig es funcional y capaz de soportar reordenación génica y producir una colección de inmunoglobulinas en el animal transgénico.

45 En una realización, al menos un locus artificial de cadena pesada de Ig está incorporado en el genoma de un animal transgénico de la invención. En una realización, el animal transgénico carece de un locus funcional de cadena ligera de Ig

En una realización, al menos un locus artificial de cadena ligera de Ig está incorporado en el genoma de un animal transgénico de la invención.

50 En una realización, al menos un locus artificial de cadena pesada de Ig y al menos un locus artificial de cadena ligera de Ig, están incorporados en el genoma de un animal transgénico de la invención.

En una realización preferida, los loci artificiales de Ig son funcionales y capaces de soportar reordenación génica y producir una colección de inmunoglobulinas en el animal transgénico, cuya colección de inmunoglobulinas incluye inmunoglobulinas que poseen un idiotipo humano.

55 En una realización, uno o más genes de región constante de los loci artificiales de Ig, comprenden al menos un gen de región constante no humana y son funcionales y capaces de soportar reordenación génica y producir una

colección de inmunoglobulinas quiméricas en el animal transgénico, cuya colección de inmunoglobulinas quiméricas incluye inmunoglobulinas quiméricas que poseen un idiotipo humano.

5 En una realización, uno o más genes de región constante de los loci artificiales de Ig, comprenden al menos un gen de región constante humana y son funcionales y capaces de soportar reordenación génica y producir una colección de inmunoglobulinas en el animal transgénico, cuya colección de inmunoglobulinas incluye inmunoglobulinas que poseen un idiotipo humano y una región constante humana.

10 También se describen métodos de obtención de un animal transgénico de la invención, cuyos métodos comprenden cruzar un animal transgénico que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado, de la línea germinal, con un segundo animal transgénico que tiene al menos un locus artificial de Ig, cuyo locus comprende: (i) una región V que posee al menos un segmento de gen V humano que codifica una línea germinal o una secuencia de aminoácidos de región V humana hipermutada; (ii) uno o más segmentos de gen J; y (iii) uno o más genes de región constante, para producir un animal transgénico F1, en el que el animal transgénico F1 comprende el al menos un locus artificial de Ig del segundo animal transgénico, y en el que el locus artificial de Ig procedente del segundo animal transgénico es funcional y capaz de soportar reordenación génica y producir una colección de inmunoglobulinas en el animal transgénico F1. El cruzamiento puede realizarse mediante mejora genética de animales o, de otro modo, combinando gametos, con inclusión de manipulaciones in vitro.

El segundo animal transgénico puede comprender al menos un locus artificial de cadena pesada de Ig.

El segundo animal transgénico puede comprender al menos un locus artificial de cadena ligera de Ig.

20 Opcionalmente, el primero y el segundo animales transgénicos carecen de un locus funcional de cadena ligera de Ig, y el segundo animal transgénico comprende un locus artificial de cadena pesada de Ig. Los animales pueden ser cruzados para producir un animal F1 que carece de un locus funcional de cadena ligera de Ig, y comprende un locus artificial de cadena pesada de Ig.

25 Opcionalmente, el segundo animal transgénico comprende al menos dos loci artificiales de Ig, que incluyen al menos un locus artificial de cadena pesada de Ig y al menos un locus artificial de cadena ligera de Ig. Opcionalmente, los loci artificiales de Ig del segundo animal transgénico son funcionales y capaces de soportar reordenación génica y producir una colección de inmunoglobulinas en el animal transgénico F1, cuya colección de inmunoglobulinas incluye inmunoglobulinas que poseen un idiotipo humano. Opcionalmente, uno o más genes de región constante de los loci artificiales de Ig del segundo animal transgénico comprenden al menos un gen de región constante no humana y son funcionales y capaces de soportar reordenación génica y producir una colección de inmunoglobulinas quiméricas en el animal transgénico F1, cuya colección de inmunoglobulinas quiméricas incluye inmunoglobulinas quiméricas que poseen un idiotipo humano. Opcionalmente, uno o más genes de región constante de los loci artificiales de Ig del segundo animal transgénico, comprenden al menos un gen de región constante humana y son funcionales y capaces de soportar reordenación génica y producir una colección de inmunoglobulinas en el animal transgénico F1, cuya colección de inmunoglobulinas incluye inmunoglobulinas que poseen un idiotipo humano y una región constante humana.

40 De modo semejante, se describen métodos que comprenden cruzar un segundo animal transgénico que tiene al menos un locus artificial de Ig, con un animal transgénico de la invención que es capaz de generar una célula germinal viable que tiene al menos un locus endógeno de Ig que está inactivado. Preferiblemente, el segundo animal transgénico comprende al menos dos loci artificiales de Ig, que incluyen al menos un locus artificial de cadena pesada de Ig y al menos un locus artificial de cadena ligera de Ig.

45 En una realización, los métodos comprenden introducir al menos un locus artificial de Ig en una célula germinal que tiene al menos un locus endógeno de Ig que ha sido o que es capaz de ser inactivado por la actividad de una o más meganucleasas, en los que el al menos un locus artificial de Ig comprende: (i) una región V que tiene al menos un segmento de gen V humano que codifica una línea germinal o una secuencia de aminoácidos hipermutada de una región V humana; (ii) uno o más segmentos de gen J; y (iii) uno o más genes de región constante, en los que el locus artificial de Ig es funcional y capaz de soportar reordenación génica y producir una colección de inmunoglobulinas artificiales en un animal transgénico derivado desde la célula germinal. Los métodos comprenden, además, derivar un animal transgénico F1 que comprende al menos un locus artificial de Ig y que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado, de la línea germinal, que ha sido inactivado por la acción de una o más meganucleasas procedentes de la célula germinal producida de este modo.

En una realización, el al menos un locus artificial de Ig incluye al menos un locus artificial de cadena pesada de Ig.

En una realización, la célula germinal carece de un locus funcional de cadena ligera de Ig y el locus artificial de Ig introducido en la célula germinal es un locus de cadena pesada de Ig.

En una realización, el al menos un locus artificial de Ig incluye al menos un locus artificial de cadena ligera de Ig.

55 En una realización preferida, al menos dos loci artificiales son introducidos en la célula germinal, e incluyen al menos un locus artificial de cadena pesada de Ig y al menos un locus artificial de cadena ligera de Ig. En una realización,

los loci artificiales de Ig son funcionales y capaces de soportar reordenación génica y producir una colección de inmunoglobulinas en el animal transgénico F1 derivado, cuya colección de inmunoglobulinas incluye inmunoglobulinas que poseen un idiotipo humano. En una realización, uno o más genes de región constante de los loci artificiales de Ig comprenden al menos un gen de región constante no humana y son funcionales y capaces de soportar reordenación génica y producir una colección de inmunoglobulinas quiméricas en el animal transgénico F1 derivado, cuya colección de inmunoglobulinas quiméricas incluye inmunoglobulinas quiméricas que poseen un idiotipo humano. En una realización, uno o más genes de región constante de los loci artificiales de Ig comprenden al menos un gen de región constante humana y son funcionales y capaces de soportar reordenación génica y producir una colección de inmunoglobulinas en el animal transgénico F1 derivado, cuya colección de inmunoglobulinas incluye inmunoglobulinas que poseen un idiotipo humano y una región constante humana.

En una realización, los métodos implican seleccionar células germinales por viabilidad y la inactivación de un locus endógeno de Ig. En una realización, los métodos implican seleccionar células germinales por la presencia de un locus artificial de Ig.

En una realización, los métodos comprenden introducir al menos un locus artificial de Ig en un oocito fertilizado o un embrión derivado desde una célula germinal que posee al menos un locus endógeno de Ig que ha sido inactivado o que es capaz de ser inactivado, por la acción de una o más meganucleasas, en los que el al menos un locus artificial de Ig comprende: (i) una región V que tiene al menos un segmento de gen V humano que codifica una línea germinal o una secuencia de aminoácidos de región V humana hipermutada; (ii) uno o más segmentos de gen J; y (iii) uno o más genes de región constante, en los que el locus artificial de Ig es funcional y capaz de soportar reordenación génica y producir una colección de inmunoglobulinas artificiales en el animal transgénico fundador o uno de sus descendientes, derivado desde el oocito fertilizado o el embrión. Los métodos comprenden, además, derivar el animal transgénico fundador desde el oocito fertilizado o el embrión y, opcionalmente, su descendencia, para obtener un animal transgénico que comprende al menos un locus artificial de Ig y que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado, de línea germinal, que ha sido inactivado por la acción de una o más meganucleasas.

En una realización, el al menos un locus artificial de Ig incluye al menos un locus artificial de cadena pesada de Ig.

En una realización, el al menos un locus artificial de Ig incluye al menos un locus artificial de cadena ligera de Ig.

En una realización el oocito fertilizado o el embrión carece de un locus funcional de cadena ligera de Ig, y el locus artificial de Ig introducido en el oocito fertilizado o el embrión es un locus de cadena pesada de Ig.

En una realización preferida, al menos dos loci artificiales son introducidos en el oocito fertilizado o el embrión, e incluyen al menos un locus artificial de cadena pesada de Ig y al menos un locus artificial de cadena ligera de Ig. En una realización, los loci artificiales de Ig son funcionales y capaces de soportar reordenación génica y producir una colección de inmunoglobulinas en el animal transgénico fundador o uno de sus descendientes, cuya colección de inmunoglobulinas incluye inmunoglobulinas que poseen un idiotipo humano. En una realización, uno o más genes de región constante de los loci artificiales de Ig, comprenden al menos un gen de región constante no humana y son funcionales y capaces de soportar reordenación génica y producir una colección de inmunoglobulinas quiméricas en el animal transgénico fundador o uno de sus descendientes, cuya colección de inmunoglobulinas quiméricas incluye inmunoglobulinas quiméricas que tienen un idiotipo humano. En una realización, uno o más genes de región constante de los loci artificiales de Ig, comprenden al menos un gen de región constante humana y son funcionales y capaces de soportar reordenación génica y producir una colección de inmunoglobulinas en el animal transgénico fundador o uno de sus descendientes, cuya colección de inmunoglobulinas incluye inmunoglobulinas que poseen un idiotipo humano y región constante humana.

La descripción proporciona métodos para producir animales transgénicos capaces de generar una célula germinal viable en la que al menos un locus endógeno de Ig está inactivado. En una realización preferida, los métodos comprenden generar un animal transgénico que tiene una construcción genómica de expresión de meganucleasas, en los que la construcción de expresión comprende una región de control de la expresión ligada de modo operable a un ácido nucleico que codifica meganucleasas. En una realización preferida, la construcción es una construcción genómica de expresión de meganucleasas que puede ser inducida para expresar en una célula germinal el ácido nucleico que codifica meganucleasas.

La descripción proporciona métodos para producir un animal transgénico que posee una célula germinal viable en la que al menos un locus endógeno de Ig está inactivado. Los métodos comprenden inactivar el locus endógeno de Ig de la célula germinal, o de una célula germinal parental o un oocito fertilizado o un embrión derivado de ellos, por expresión en ellos de una meganucleasa.

La descripción proporciona una célula germinal viable en la que al menos un locus endógeno de Ig es capaz de ser inactivado. En una realización preferida, la célula germinal comprende una construcción genómica de expresión de meganucleasas, en la que la construcción de expresión comprende una región de control de la expresión ligada de modo operable a un ácido nucleico que codifica meganucleasas. En una realización preferida, la construcción es una construcción genómica de expresión de meganucleasas que puede ser inducida para expresar en una célula germinal el ácido nucleico que codifica meganucleasas.

Opcionalmente, la célula germinal comprende al menos un locus artificial de cadena pesada de Ig.

Opcionalmente, la célula germinal comprende al menos un locus artificial de cadena ligera de Ig.

Opcionalmente, la célula germinal comprende al menos un locus artificial de cadena pesada de Ig y al menos un locus artificial de cadena ligera de Ig.

- 5 También se describe una célula germinal viable en la que al menos un locus endógeno de Ig está inactivado.

Opcionalmente, la célula germinal comprende al menos un locus artificial de cadena pesada de Ig.

Opcionalmente, la célula germinal comprende al menos un locus artificial de cadena ligera de Ig.

Opcionalmente, la célula germinal comprende al menos un locus artificial de cadena pesada de Ig y al menos un locus artificial de cadena ligera de Ig.

- 10 La descripción proporciona métodos para producir una célula germinal viable que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado. Los métodos implican expresar al menos una meganucleasa en una célula germinal, un oocito fertilizado o un embrión, para generar una célula germinal viable que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado. La meganucleasa expresada de este modo reconoce una secuencia diana de meganucleasas presente en, o proximal a, dicho locus endógeno de Ig.

- 15 Opcionalmente, cuando la meganucleasa es expresada en una célula germinal, la célula germinal en la que es expresada la meganucleasa proporciona una célula germinal viable que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado. Alternativamente, puede ser obtenida una célula germinal viable que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado, partiendo de un animal derivado desde la célula germinal en la que había sido expresada la meganucleasa.

- 20 Opcionalmente, cuando la meganucleasa es expresada en un oocito fertilizado o en un embrión, la célula germinal viable que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado, puede ser obtenida partiendo de un animal derivado desde el oocito fertilizado o el embrión en el que había sido expresada la meganucleasa.

Opcionalmente, el al menos un locus endógeno de Ig es inactivado in vitro. En una realización, el al menos un locus endógeno de Ig es inactivado in vivo.

- 25 Opcionalmente, la célula germinal comprende, además, al menos un locus artificial de Ig. En una realización, el al menos un locus artificial de Ig incluye al menos un locus artificial de cadena pesada de Ig. En una realización, el al menos un locus artificial de Ig incluye al menos un locus artificial de cadena ligera de Ig.

Opcionalmente, al menos dos loci artificiales de Ig son introducidos en la célula germinal, e incluyen al menos un locus artificial de cadena pesada de Ig y al menos un locus artificial de cadena ligera de Ig.

- 30 También se describen anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales e hibridomas, y métodos de obtención y de uso de los mismos que resultan de la producción de anticuerpos en los animales transgénicos descritos en esta invención que son portadores de uno o más loci artificiales y que poseen uno o más loci endógenos de Ig inactivados mediante la actividad de una meganucleasa.

- 35 Opcionalmente, los anticuerpos son anticuerpos solamente de cadena pesada, que son producidos usando animales transgénicos que carecen de un locus funcional de cadena ligera de Ig y comprenden un locus artificial de cadena pesada, conseguidos por métodos descritos en esta memoria.

Además, se describen métodos para producir anticuerpos usando animales transgénicos proporcionados en esta invención. Los métodos comprenden inmunizar con un inmunógeno un animal transgénico de la invención, cuyo animal tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado y que es portador de al menos un locus artificial de Ig, como aquí se describe. En un método preferido, el animal transgénico es nulicigótico para cadenas pesadas de Ig endógenas y/o cadenas ligeras de Ig endógenas y, por consiguiente, es incapaz de producir inmunoglobulinas endógenas. En un método el animal transgénico carece de un locus funcional de cadena ligera de Ig y comprende un locus artificial de cadena pesada de Ig.

- 45 La descripción incluye composiciones de antisueros policlonales producidas de este modo. Los antisueros policlonales de la invención comprenden, preferiblemente, anticuerpos que poseen un idiotipo humano. Preferiblemente, un antisuero policlonal comprende anticuerpos que consisten esencialmente en anticuerpos que poseen un idiotipo humano.

La invención proporciona métodos para producir anticuerpos monoclonales según se ha descrito antes.

En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal posee un idiotipo humano.

- 50 La invención proporciona anticuerpos monoclonales producidos por los métodos anteriores

La invención proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican tales anticuerpos monoclonales.

La invención incluye anticuerpos monoclonales totalmente humanos producidos por los métodos para producir anticuerpos monoclonales totalmente humanos anteriormente descritos..

5 En una realización, el inmunógeno empleado en los métodos de esta invención, comprende un organismo causante de una enfermedad o una parte antigénica del mismo.

En una realización, el inmunógeno empleado en los métodos de esta invención es un antígeno endógeno para los seres humanos. En una realización alternativa, el inmunógeno usado en los métodos de esta invención es un antígeno exógeno para los seres humanos

10 La descripción incluye métodos para neutralizar o modular la actividad de una entidad antigénica en un componente del cuerpo humano. En una realización, los métodos comprenden poner en contacto el componente del cuerpo, con una composición de antisueros policlonales de la invención, en los que la composición de antisueros policlonales comprende moléculas de inmunoglobulinas que se unen específicamente a la entidad antigénica y neutralizan o modulan la actividad de esta entidad.

15 Opcionalmente, los métodos comprenden poner en contacto el componente del cuerpo con un anticuerpo monoclonal de la invención, en los que el anticuerpo monoclonal se une específicamente a la entidad antigénica y neutraliza o modula la actividad de esta entidad.

Opcionalmente, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal totalmente humano.

Opcionalmente, la entidad antigénica procede de un organismo que ocasiona una enfermedad infecciosa.

Opcionalmente, la entidad antigénica es una molécula de la superficie celular.

20 Opcionalmente, la entidad antigénica es una citoquina humana o una quimioquina humana.

Opcionalmente, la entidad antigénica es una molécula de la superficie celular situada sobre una célula cancerosa maligna.

Pueden derivarse células desde los animales transgénicos de la invención.

Pueden derivarse células desde el bazo de animales transgénicos de la invención.

25 Además, se describen células B que derivan de animales transgénicos de la invención, cuyas células B son capaces de producir anticuerpos que poseen un idiotipo humano y células germinales que derivan de los animales transgénicos de la invención.

La descripción incluye métodos de obtención de hibridomas capaces de producir anticuerpos que poseen un idiotipo humano. Los métodos comprenden el uso de células que proceden de animales transgénicos de la invención.

30 La descripción incluye hibridomas producidos de este modo y anticuerpos que poseen un idiotipo humano, cuyos anticuerpos son producidos por un hibridoma de la invención. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención, cuyo anticuerpo posee un idiotipo humano.

También se describen métodos para tratar a un paciente necesitado de tratamiento, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la invención.

35 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 ilustra una representación esquemática de una cadena pesada artificial que consiste en una región V, D y J humana, un intensificador intrónico de la rata y varios genes artificiales de región constante. Los genes artificiales de región constante contienen exones que codifican un dominio CH1 humano y los dominios CH2, 3 y 4 de la rata. Secuencias de extensión de membrana y secuencias polipeptídicas citoplásmicas están codificadas por exones de la rata.

40 Figura 2. Representación esquemática de la interacción de I-SceI y DNA en el extremo 3' de la secuencia de reconocimiento

Figura 3. Representación esquemática de la interacción del extremo 5' de la secuencia de reconocimiento de I-SceI con I-SceI.

45 Figura 4. Representación esquemática del mecanismo de reconocimiento de secuencia de I-CreI (de Nucleic Acids Res. 34, 4791-4800)

Figura 5. Diagrama esquemático de la estrategia seguida para alterar la secuencia de reconocimiento de I-CreI.

Figura 6. Proteínas de dedo de cinc (ZFP) diseñadas contra secuencias que codifican IgM de la rata, fueron expresadas en células, se preparó DNA cromosómico y la región apropiada del locus de IgM fue amplificada por PCR. Los productos de la reacción fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida. La figura ilustra un ejemplo típico que demuestra la actividad de escisión.

5 **Descripción detallada de la invención**

Por "locus artificial de inmunoglobulina" se entiende un locus de inmunoglobulina que comprende fragmentos de loci de inmunoglobulinas humanas y no humanas, e incluyen múltiples segmentos de genes de inmunoglobulinas, que incluyen al menos un segmento de gen (V) de una región variable, uno o más segmentos de gen J, uno o más segmentos de gen D en el caso de un locus de cadena pesada y uno o más segmentos de genes de región constante. En la presente invención, al menos uno de los segmentos de gen V codifica una línea germinal o una secuencia de aminoácidos hipermutada de región V humana. En una realización preferida un locus artificial de inmunoglobulina, de la invención, es funcional y capaz de reordenación y de producción de una colección de inmunoglobulinas. En una realización preferida, al menos un segmento de gen D es un segmento de gen D humano. "Locus artificial de Ig" tal como se usa en esta memoria, puede referirse a loci sin reordenar, a loci parcialmente reordenados, y a loci reordenados. Los loci artificiales de Ig incluyen loci artificiales de cadenas ligeras de Ig y loci artificiales de cadenas pesadas de Ig. En una realización, un locus artificial de Ig comprende un gen de región C no humana y es capaz de producir una colección de inmunoglobulinas que incluye inmunoglobulinas quiméricas que poseen una región C no humana. En una realización, un locus artificial de Ig comprende un gen de región C humana y es capaz de producir una colección de inmunoglobulinas, que incluye inmunoglobulinas que poseen una región C humana. En una realización un locus artificial de Ig comprende un "gen artificial de región constante", por cuya expresión se entiende un gen de una región constante que comprende secuencias de nucleótidos que proceden de genes de regiones constantes humanas y no humanas. Por ejemplo, un gen artificial de una región constante C que sirve de ejemplo, es un gen de región constante que codifica un dominio CH1 de IgG humana y los dominios CH2 y CH3 de IgG de la rata.

En algunas realizaciones, un locus artificial de cadena pesada de Ig carece de CH1, o una secuencia equivalente que permite que la inmunoglobulina que resulta evite la asociación típica de chaperona de inmunoglobulinas. Tales loci artificiales dan lugar a la producción de anticuerpos de cadena pesada solamente, en animales transgénicos que carecen de un locus funcional de cadena ligera de Ig y que, por tanto, no expresan una cadena ligera funcional de Ig. Tales loci artificiales de cadena pesada de Ig se usan en métodos de la presente invención para producir animales transgénicos que carecen de un locus funcional de cadena ligera de Ig, y que comprenden un locus artificial de cadena pesada de Ig, cuyos animales son capaces de producir anticuerpos de cadena pesada solamente. Alternativamente, un locus artificial de Ig puede ser manipulado in situ para romper la región CH1 o una región equivalente y generar un locus artificial de cadenas pesadas de Ig, lo que proporciona la producción de anticuerpos de cadenas pesadas solamente. En cuanto a la producción de anticuerpos de cadenas pesadas solamente, en ratones deficientes en cadenas ligeras, véase, por ejemplo, la publicación de Zou et al., JEM 204:3271-3283, 2007.

Por "idiotipo humano" se entiende una secuencia polipeptídica presente en un anticuerpo humano, codificada por un segmento de gen V de inmunoglobulina. La expresión "idiotipo humano" tal como se usa en esta memoria, incluye tanto secuencias naturales de un anticuerpo humano, como secuencias sintéticas sustancialmente idénticas a la del polipéptido encontrado en anticuerpos humanos naturales. Por "sustancialmente" se entiende que el grado de identidad entre las secuencias de aminoácidos es al menos de 85%-95%, aproximadamente. De preferencia, el grado de identidad entre las secuencias de aminoácidos es mayor que 90% y, más preferiblemente, mayor que 95%.

Por un "anticuerpo quimérico" o una "inmunoglobulina quimérica" se entiende una molécula de inmunoglobulina que comprende una parte de una secuencia polipeptídica de una inmunoglobulina humana (o una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico de una Ig humana) y una parte de una secuencia polipeptídica de una inmunoglobulina no humana. Las moléculas de inmunoglobulinas quiméricas de la presente invención son inmunoglobulinas con regiones Fc no humanas o regiones Fc artificiales, e idiotipos humanos. Tales inmunoglobulinas pueden ser aisladas desde animales de la invención que han sido obtenidos para producir moléculas de inmunoglobulinas quiméricas.

Por "región Fc artificial" se entiende una región Fc codificada por un gen artificial de región constante.

La expresión "segmento génico de Ig" tal como se usa en esta memoria, alude a segmentos de DNA que codifican diversas partes de una molécula de Ig, que están presentes en la línea germinal de animales y de seres humanos, y que están reunidos en células B formando genes de Ig reordenados. Por tanto, segmentos génicos de Ig tal como se usa en esta memoria, incluyen segmentos de gen V, segmentos de gen D, segmentos de gen J y segmentos génicos de regiones C.

La expresión "segmento génico de Ig humana" tal como se usa en esta memoria, incluye tanto secuencias naturales de un segmento génico de una Ig humana, como formas degeneradas de secuencias naturales de un segmento génico de una Ig humana, así como también secuencias sintéticas que codifican una secuencia polipeptídica sustancialmente idéntica a la del polipéptido codificado por una secuencia natural de un segmento génico de una Ig

humana. Por "sustancialmente" se entiende que el grado de identidad entre las secuencias de aminoácidos es, al menos, 85%-95%, aproximadamente. De preferencia, el grado de identidad entre las secuencias de aminoácidos es mayor que 90% y, más preferiblemente, mayor que 95%.

5 Por "meganucleasa" se entiende una endodesoxirribonucleasa que reconoce sitios de reconocimiento largos de DNA, de, preferiblemente, al menos 12, más preferiblemente al menos 13, más preferiblemente al menos 14., más preferiblemente al menos 15, más preferiblemente al menos 16, más preferiblemente al menos 17 y, lo más preferible, de al menos una longitud de 18 nucleótidos. Las meganucleasas incluyen nucleasas de dedo de cinc, endonucleasas naturales buscadoras de blancos y nucleasas de dedo de cinc generadas, habituales, y endonucleasas buscadoras de blancos. Lo que se requiere para usar en la invención es que la meganucleasa reconozca una secuencia diana de meganucleasas, presente en, o proximal a, un locus endógeno de Ig existente en el animal en cuestión, de tal modo que pueda introducirse una mutación funcional en el locus de Ig mediante la acción de la meganucleasa. Para mas discusión acerca de las meganucleasas, véanse, por ejemplo, la Publicación de las Solicitudes de Patentes de EE.UU. Nos. 20060206949, 20060153826, 20040002092, 20060078552, y 20050064474.

15 Nucleasas de dedo de cinc con especificidad alterada pueden ser generadas combinando dedos de cinc individuales con diferentes dianas de tripletes. La especificidad de endonucleasas naturales buscadoras de blancos puede alterarse por construcción de proteínas basadas en estructuras. Por ejemplo, véase la publicación de Proteus y Carroll, Nature Biotechnology, 23(8) 967-97, 2005.

20 Un animal que tiene un "locus de Ig inactivado, de línea germinal", o "un locus endógeno de Ig inactivado, de línea germinal" o "una mutación de línea germinal en un locus endógeno de Ig", tiene en todas las células un locus endógeno de Ig inactivado, es decir, en todas las células somáticas y germinales. En la presente invención, animales que tienen loci de línea germinal inactivados, son producidos por mutación, como la efectuada mediante la acción de una meganucleasa en una célula germinal que da lugar al animal resultante o a uno de sus predecesores.

Producción de células germinales viables y animales transgénicos que tienen loci endógenos de Ig inactivados

25 En la presente invención se utilizan meganucleasas para activar loci endógenos de Ig así como producir células germinales viables que tienen, al menos, un locus endógeno de Ig inactivado. Los métodos implican expresar al menos una meganucleasa en una célula germinal, un oocito fertilizado o un embrión, para generar una célula germinal viable que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado. La meganucleasa expresada de este modo reconoce una secuencia diana de meganucleasas presente en, o proximal a, un locus endógeno de Ig existente en el animal en cuestión.

35 En una realización, en la que la meganucleasa es expresada en una célula germinal, la célula germinal en la que la meganucleasa es expresada proporciona una célula germinal viable que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado. Alternativamente, una célula germinal viable que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado puede ser obtenida a partir de un animal derivado desde la célula germinal en la que se había expresado la meganucleasa.

En una realización, en la que la meganucleasa es expresada en un oocito fertilizado o en un embrión, la célula germinal viable que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado, puede ser obtenida a partir de un animal derivado desde el oocito fertilizado o el embrión en el que se había expresado la meganucleasa.

40 La invención proporciona también métodos para producir animales transgénicos que comprenden al menos un locus endógeno de Ig inactivado, de línea germinal. Los métodos comprenden derivar un animal transgénico desde una célula germinal viable que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado, producida según los métodos de esta invención.

En una realización, la célula germinal viable que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado, comprende, además, un locus artificial de Ig, y el animal transgénico así producido comprende un locus artificial de Ig.

45 En una realización, los métodos comprenden, además, introducir un locus artificial de Ig en la célula germinal viable que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado, o en una célula germinal descendiente de la misma o un oocito fertilizado o un embrión derivado de ella, y el animal transgénico así producido comprende un locus artificial de Ig.

50 En una realización, los métodos comprenden combinar una célula germinal viable que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado o una célula germinal descendiente de la misma, con un gameto que comprende un locus artificial de Ig, y el animal transgénico así producido comprende un locus artificial de Ig.

Inactivación de loci endógenos de Ig

La inactivación de loci endógenos de Ig se realiza utilizando meganucleasas específicas para fragmentos génicos de inmunoglobulinas en loci de cadenas pesadas y/o cadenas ligeras, endógenos con respecto al animal en cuestión.

55 En una realización pueden inducirse roturas de dobles cadenas por inyección de una meganucleasa en células

germinales, oocitos fertilizados o embriones. Alternativamente, pueden inyectarse en los mismos vectores de expresión o un ácido nucleico que codifica una meganucleasa y que son capaces de ser expresados en células germinales, oocitos fertilizados o embriones.

5 En una realización, el método implica transfectar células germinales, que pueden incluir precursores de las mismas tales como células pluripotentes espermatogoniales, in vitro o in vivo, con un ácido nucleico o una construcción de expresión que codifica una meganucleasa. Por ejemplo, véase la publicación de Ryu et al., en *J. Aridrol.*, 28:353-360, 2007; Orwig et al., *Biol. Report.* 67:874-879, 2002.

10 En una realización preferida, una construcción de expresión de meganucleasas es integrada en el genoma del animal en cuestión. La expresión del transgeno que codifica la meganucleasa, en células germinales, puede dar por resultado roturas de dobles cadenas en loci endógenos de Ig y la mutación subsiguiente del sitio de restricción. El apareamiento de tales animales transgénicos da como resultado descendientes con loci de inmunoglobulinas mutados/inactivados.

15 En una realización de la presente invención altamente preferida, una construcción de expresión de meganucleasas que puede regularse es integrada en el genoma del animal en cuestión, cuya construcción que puede regularse es inducible en células germinales. Tales construcciones proporcionan una minimización de los efectos tóxicos asociados con la expresión de una meganucleasa particular por medio de una expresión controlada a través de promotores inducibles, por ejemplo, promotores inducibles por calor, promotores inducibles por radiaciones, operón de tetraciclina, promotores hormonales inducibles, y promotores inducibles por dimerización de transactivadores, y semejantes. Por ejemplo, véase la publicación de Vilboa et al., en *Current Gene Therapy*, 6:421-438, 2006.

20 Alternativamente, la expresión de una meganucleasa puede ser inducida en un embrión derivado desde la célula germinal.

25 En una realización, una única meganucleasa es expresada en una célula germinal, en la que la meganucleasa reconoce una secuencia diana en un locus de inmunoglobulina o proximal a él, endógeno respecto a la célula germinal del animal en cuestión. En una realización preferida, la secuencia diana de la meganucleasa está en un segmento de gen J o proximal respecto a éste. En otra realización preferida, la secuencia diana de la meganucleasa está en un gen de región constante de una inmunoglobulina o proximal con respecto a éste. En una realización preferida, el gen de región constante de una inmunoglobulina codifica una inmunoglobulina μ .

30 En una realización preferida, se emplean al menos dos meganucleasas que tienen secuencias diana diferentes. Las al menos dos meganucleasas son expresadas en una célula germinal, en la que las meganucleasas reconocen secuencias diana diferentes en, o proximal a, un locus de inmunoglobulina, endógeno con respecto a la célula germinal del animal en cuestión.

35 En una realización preferida, la primera y segunda meganucleasas hacen blanco en segmentos de gen J. En una realización, la primera y segunda meganucleasas hacen blanco en secuencias que, tomadas en conjunto, están aguas arriba y aguas debajo de uno o más segmentos de gen J dentro del locus endógeno de Ig, y la escisión por la primera y segunda meganucleasas codificadas produce la supresión de un segmento de DNA genómico que comprende el uno o más segmentos de gen J.

40 En otra realización, la primera y segunda meganucleasas hacen blanco en segmentos génicos de región constante. En una realización, la primera y segunda meganucleasas hacen blanco en secuencias que están situadas, tomadas en conjunto, aguas arriba y aguas abajo de uno o más segmentos génicos de región constante de inmunoglobulina, y la escisión por la primera y segunda meganucleasas codificadas produce la supresión de un segmento de DNA genómico que comprende el uno o más segmentos génicos de región constante de inmunoglobulina. En una realización preferida el gen de región constante codifica una inmunoglobulina μ .

45 En una realización, un locus endógeno entero de cadena pesada de Ig y/o de cadena ligera de Ig, o partes grandes del mismo, son suprimidos desde el genoma del animal en cuestión. A tales animales se alude también como que comprenden un locus endógeno que ha sido inactivado.

50 En una realización, se usa al menos una meganucleasa para romper la región CH1 de un locus endógeno de una cadena pesada de Ig, quedando intacto el resto del locus siendo capaz de producir una cadena pesada de Ig que evita la asociación típica de chaperonas de inmunoglobulinas. Preferiblemente, esta señalización como blanco de la región CH1 se realiza en un animal que carece de un locus funcional de cadena ligera de Ig. Tal señalización como blanco en tales animales es útil para producir anticuerpos de cadenas pesadas solamente.

En una realización, se usa más de una meganucleasa para hacer blanco en la región CH1 dentro del locus de cadena pesada de Ig.

En una realización, se usan dos meganucleasas que reconocen sitios adyacentes. En una realización, los sitios son elementos de un palíndromo. En una realización, las dos meganucleasas están ligadas por un engarce.

En realizaciones preferidas, las estrategias de apareamiento empleadas están diseñadas para obtener animales que son nulicigóticos para cadenas ligeras de Ig endógenas y/o cadenas pesadas de Ig endógenas.

Animales transgénicos que comprenden construcciones genómicas de expresión de meganucleasas que puede regularse

- 5 En un aspecto, la invención proporciona animales transgénicos que comprenden al menos una construcción genómica de expresión de meganucleasas que puede regularse.

Los animales transgénicos están seleccionados entre animales de laboratorio pequeños, en particular aves (pollo, pavo, codorniz, pato, faisán o ganso y semejantes), roedores (por ejemplo, ratas, hamsters y cobayas), y comadrejas (por ejemplo, hurones).

- 10 En una realización preferida, la construcción genómica de expresión de meganucleasas que puede regularse comprende una región de control de la expresión inducible ligada de modo operable a un ácido nucleico que codifica una meganucleasa. La región de control de la expresión inducible, es funcional de modo inducible en una célula germinal del animal transgénico particular, y la meganucleasa codificada es selectiva para una secuencia diana de meganucleasas situada en, o proximal a, un locus endógeno de inmunoglobulina del animal en cuestión.

- 15 Una construcción de expresión de meganucleasas que puede regularse proporciona una minimización de los efectos citotóxicos asociados con la expresión de una meganucleasa particular, por medio de una expresión controlada a través de promotores inducibles, por ejemplo, promotores inducibles por calor, promotores inducibles por radiaciones, operón de tetraciclina, promotores hormonales inducibles y promotores inducibles por dimerización de transactivadores, y semejantes.

- 20 En una realización preferida, un animal transgénico de la invención comprende dos construcciones genómicas de expresión de meganucleasas que puede regularse, que comprenden dos ácidos nucleicos diferentes que codifican dos meganucleasas diferentes que reconocen dos secuencias diana distintas. Las dos meganucleasas, en combinación, actúan suprimiendo un segmento de DNA genómico de un locus endógeno de Ig y con ello le inactivan.

- 25 Pueden obtenerse animales transgénicos que comprenden al menos una construcción genómica de expresión de meganucleasas que puede regularse, por medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un vector transgénico que contiene una región de control de la expresión inducible ligado de modo operable a un ácido nucleico que codifica una meganucleasa, puede ser introducido en una célula o en células receptoras e integrado luego en el genoma de la célula o células receptoras por integración aleatoria o mediante integración dirigida.

- 30 Para la integración aleatoria, tal vector transgénico puede ser introducido en una célula receptora mediante tecnología transgénica estándar. Por ejemplo, un vector transgénico puede ser inyectado directamente en el pronúcleo de un oocito fertilizado. Un vector transgénico puede ser introducido también por incubación conjunta de esperma con el vector transgénico antes de la fertilización del oocito. A partir de los oocitos fertilizados pueden desarrollarse animales transgénicos. Otro modo de introducir un vector transgénico consiste en transfectar células pluripotentes embrionarias u otras células pluripotentes (por ejemplo, células germinales primordiales) e inyectar a continuación las células modificadas genéticamente, en los embriones que se están desarrollando. Alternativamente, un vector transgénico (simple o en combinación con reactivos facilitadores) puede ser inyectado directamente en un embrión que se está desarrollando. En otra realización, el vector transgénico es introducido en el genoma de una célula, y un animal es derivado desde la célula transfectada mediante clonación de transferencia nuclear.

- 40 Para la integración dirigida, un vector transgénico tal puede ser introducido en células receptoras apropiadas tales como células pluripotentes embrionarias o en células somáticas ya diferenciadas. Después de ello, pueden seleccionarse por métodos estándar, células en las que el transgeno se ha integrado mediante recombinación homóloga, en el genoma del animal, en el sitio elegido como blanco. Las células seleccionadas pueden fusionarse luego con células unitarias de transferencia nuclear, enucleadas, por ejemplo oocitos o células pluripotentes embrionarias, células que son totipotentes y capaces de formar un neonato funcional. La fusión se lleva a cabo según técnicas convencionales que están bien establecidas. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de Cibelli et al., Science (1998) 280:1256 y Zhou et al., Science (2003) 301:1179. La enucleación de oocitos y la transferencia nuclear pueden llevarse a cabo también mediante microcirugía usando pipetas de inyección (véase, por ejemplo, la publicación de Wakayama et al., Nature (1998) 394-369). Las células resultantes son cultivadas luego en un medio apropiado, y transferidas a receptores sincronizados para generar animales transgénicos. Alternativamente, las células modificadas genéticamente, seleccionadas, pueden ser inyectadas en embriones que se están desarrollando.

- 45 técnicas convencionales que están bien establecidas. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de Cibelli et al., Science (1998) 280:1256 y Zhou et al., Science (2003) 301:1179. La enucleación de oocitos y la transferencia nuclear pueden llevarse a cabo también mediante microcirugía usando pipetas de inyección (véase, por ejemplo, la publicación de Wakayama et al., Nature (1998) 394-369). Las células resultantes son cultivadas luego en un medio apropiado, y transferidas a receptores sincronizados para generar animales transgénicos. Alternativamente, las células modificadas genéticamente, seleccionadas, pueden ser inyectadas en embriones que se están desarrollando.

- 50 apropiado, y transferidas a receptores sincronizados para generar animales transgénicos. Alternativamente, las células modificadas genéticamente, seleccionadas, pueden ser inyectadas en embriones que se están desarrollando.

En una realización, se usa una meganucleasa para aumentar la frecuencia de recombinación homóloga en un sitio elegido como blanco mediante escisión de DNA bicatenario.

- 55 *Animales transgénicos que comprenden loci artificiales de Ig y capaces de producir anticuerpos que poseen idiotipos humanos*

En un aspecto, la invención proporciona animales transgénicos capaces de producir inmunoglobulinas que poseen idiotipos humanos, así como también métodos de obtención de los mismos.

5 Los animales transgénicos utilizados son seleccionados particularmente entre aves (pollos, pavos, codornices, patos, faisanes o gansos, y semejantes), roedores (por ejemplo, ratas, hamsters y cobayas), y comadrejas (por ejemplo, hurones).

10 Los animales transgénicos utilizados en la invención para producir anticuerpos humanizados, llevan mutaciones de la línea germinal en loci endógenos de Ig que han sido realizadas mediante la actividad de una o más meganucleasas. En una realización preferida, los animales transgénicos son nulicigóticos para cadenas pesadas de Ig endógenas y/o cadenas ligeras de Ig endógenas. Además, estos animales son portadores de al menos un locus artificial de Ig que es funcional y capaz de producir en el animal transgénico una colección de moléculas de inmunoglobulinas. Los loci artificiales de Ig utilizados en la invención incluyen al menos un segmento de gen V humano.

15 En una realización preferida, los animales transgénicos son portadores de al menos un locus artificial de cadena pesada de Ig y al menos un locus artificial de cadena ligera de Ig que son, cada uno, funcionales y capaces de producir una colección de moléculas de inmunoglobulinas en el animal transgénico, cuya colección de moléculas de inmunoglobulinas incluye anticuerpos que poseen un idiotipo humano. En una realización, se usan loci artificiales que incluyen al menos un gen C no humano, y se proporcionan animales capaces de producir anticuerpos quiméricos que poseen un idiotipo humano y región constante no humana. En una realización se utilizan loci artificiales que incluyen al menos un gen C humano, y se proporcionan animales capaces de producir anticuerpos s
20 que poseen un idiotipo humano y región constante humana.

En otra realización preferida, los animales transgénicos llevan al menos un locus artificial de cadena pesada de Ig y carecen de un locus funcional de cadena ligera de Ig. Tales animales encuentran uso para producir anticuerpos de cadenas pesadas solamente.

25 La producción de tales animales transgénicos lleva consigo la integración de uno o más loci artificiales de cadena pesada de Ig y uno o más loci artificiales de cadena ligera de Ig, en el genoma de un animal transgénico que tiene al menos un locus endógeno de Ig que ha sido o que puede ser inactivado por la acción de una o más meganucleasas. Preferiblemente, los animales transgénicos son nulicigóticos para cadenas pesadas de Ig endógenas y/o cadenas ligeras de Ig endógenas y, por consiguiente, son incapaces de producir inmunoglobulinas endógenas. Con independencia de la ubicación cromosómica, un locus artificial de Ig de la presente invención tiene la capacidad de soportar reordenación génica y producir con ello una colección diversificada de moléculas de inmunoglobulinas. A un locus de Ig que tiene la capacidad de soportar reordenación génica se alude también en esta memoria como un locus de Ig "funcional", y a los anticuerpos con una diversidad generada por un locus de Ig funcional se alude también en esta memoria como anticuerpos "funcionales" o una colección "funcional" de anticuerpos.
30

35 Los loci artificiales utilizados para generar tales animales transgénicos incluyen, todos, múltiples segmento génicos de inmunoglobulinas que incluyen al menos un segmento génico de región V, uno o más segmentos de gen J, uno o más segmentos de gen D en el caso de un locus de cadena pesada, y uno o más genes de región constante. En la presente invención, al menos uno de los segmentos de gen V codifica una línea germinal o una secuencia de aminoácidos de región V humana hipermutada. Por consiguiente, tales animales transgénicos tienen la capacidad de producir una colección diversificada de moléculas de inmunoglobulinas, que incluyen anticuerpos que poseen un
40 idiotipo humano.

En una realización, los loci artificiales utilizados comprenden al menos un segmento génico de una región C no humana. Por tanto, tales animales transgénicos poseen la capacidad de producir una colección diversificada de moléculas de inmunoglobulinas, que incluyen anticuerpos quiméricos que poseen un idiotipo humano.

45 En una realización, los loci artificiales utilizados comprenden al menos un segmento génico de una región C humana. Por tanto, tales animales transgénicos poseen la capacidad de producir una colección diversificada de moléculas de inmunoglobulinas, que incluyen anticuerpos que poseen un idiotipo humano y una región constante humana.

50 En una realización, los loci artificiales utilizados comprenden al menos un gen artificial de una región constante. Por ejemplo, un gen artificial de una región constante C que sirve de ejemplo es un gen de una región constante que codifica un dominio CH1 de IgG humana y los dominios CH2 y CH3 de IgG de la rata. Por consiguiente, tales animales transgénicos poseen la capacidad de producir una colección diversificada de moléculas de inmunoglobulinas, que incluyen anticuerpos que poseen un idiotipo humano y una región constante artificial que comprende componentes humanos y no humanos, ambos.

55 El vector transgénico que contiene un locus artificial de Ig es introducido en la célula o células receptoras e integrado después en el genoma de la célula o células receptoras por integración aleatoria o por integración dirigida.

Para integración aleatoria, puede introducirse en una célula receptora un vector transgénico que contiene un locus artificial de Ig mediante tecnología transgénica estándar. Por ejemplo, un vector transgénico puede ser inyectado

directamente en el pronúcleo de un oocito fertilizado. Un vector transgénico puede ser introducido también mediante incubación conjunta de esperma con el vector transgénico antes de la fertilización del oocito. De los oocitos fertilizados pueden ser desarrollados animales transgénicos. Otro modo de introducir un vector transgénico es por transfección de células pluripotentes embrionarias u otras células pluripotentes (por ejemplo, células germinales primordiales) e inyectando seguidamente en embriones en desarrollo las células modificadas genéticamente. Alternativamente, un vector transgénico (simple o en combinación con reactivos facilitadores) puede ser inyectado directamente en un embrión en desarrollo. En último lugar, son producidos animales transgénicos quiméricos partiendo de los embriones que contienen el transgeno de Ig artificial integrado en el genoma de al menos algunas células somáticas del animal transgénico. En otra realización, el vector transgénico es introducido en el genoma de una célula y un animal es derivado desde la célula transfectada mediante clonación de transferencia nuclear.

En una realización preferida, un transgeno que contiene un locus artificial de Ig es integrado aleatoriamente en el genoma de células receptoras (tales como oocitos fertilizados o embriones en desarrollo). Las células receptoras son derivadas desde un animal que tiene al menos un locus endógeno de Ig que ha sido inactivado por la acción de una o más meganucleasas. Alternativamente, animales transgénicos portadores de loci artificiales de inmunoglobulinas, pueden ser cruzados con animales transgénicos que tienen al menos un locus endógeno de Ig que ha sido inactivado por la acción de una o más meganucleasas. Independientemente del método particular utilizado, en una realización preferida, se obtienen descendientes que son nulicigóticos para cadenas pesadas de Ig y/o cadenas ligeras de Ig, endógenas, y, por tanto, incapaces de producir inmunoglobulinas endógenas y capaces de producir inmunoglobulinas transgénicas.

Para integración dirigida, puede introducirse un vector transgénico en células receptoras apropiadas tales como células pluripotentes embrionarias, otras células pluripotentes o células somáticas ya diferenciadas. Después de ello, pueden seleccionarse por métodos estándar células en las que el transgeno ha sido integrado en el genoma del animal y ha reemplazado el locus endógeno de Ig correspondiente mediante recombinación homóloga. Las células seleccionadas pueden fusionarse luego con células unitarias de transferencia nuclear enucleadas, por ejemplo, oocitos o células pluripotentes embrionarias, células que son totipotentes y capaces de formar un neonato funcional. La fusión se efectúa según técnicas convencionales que están bien establecidas. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de Cibelli et al., Science (1998) 280:1256; Zhou et al., Science (2003) 301:1179. La enucleación de oocitos y la transferencia nuclear pueden llevarse a cabo también mediante microcirugía empleando pipetas de inyección. (Véase, por ejemplo, la publicación de Wakayama et al., Nature (1998) 394:369). Las células resultantes son cultivadas luego en un medio apropiado y transferidas a receptores sincronizados para generar animales transgénicos. Alternativamente, las células modificadas genéticamente, seleccionadas, pueden ser inyectadas en embriones en desarrollo que, seguidamente, son desarrollados en animales quiméricos.

En una realización, se usa una meganucleasa para aumentar la frecuencia de la recombinación homóloga en un sitio diana mediante escisión de DNA bicatenario. Para realizar la integración en loci endógenos de inmunoglobulinas puede usarse una meganucleasa específica del sitio. En una realización, se usa una meganucleasa que hace blanco en un locus endógeno de Ig, para aumentar la frecuencia de la recombinación homóloga y el reemplazo de un locus endógeno de Ig o partes del mismo con un locus artificial de Ig o partes del mismo.

En una realización el animal transgénico carece de un locus funcional de cadena ligera de Ig, y comprende un locus artificial de cadena pesada de Ig.

40 *Loci artificiales de Ig*

La presente invención está dirigida, además, a loci artificiales de Ig y a su uso para obtener animales transgénicos capaces de producir inmunoglobulinas que poseen un idiotipo humano.

Cada locus artificial de Ig comprende muchos segmentos génicos de inmunoglobulinas, que incluyen al menos un segmento génico de una región V, uno o más segmentos de gen J, uno o más segmentos de gen D en el caso de un locus de cadena pesada, y uno o más genes de región constante. En la presente invención, al menos uno de los segmentos de gen V codifica una línea germinal o una secuencia de aminoácidos de una región V humana, hipermutada. Por consiguiente, tales animales transgénicos poseen la capacidad de producir una colección diversificada de moléculas de inmunoglobulinas, que incluyen anticuerpos que poseen un idiotipo humano. En los loci artificiales de Ig pueden estar incluidos segmentos de gen D derivados de seres humanos o no humanos, de loci de cadenas pesadas. Los segmentos génicos de tales loci están yuxtapuestos unos con respecto a los otros en una configuración sin reordenar (o "la configuración de la línea germinal"), o en una configuración parcial o totalmente reordenada. Los loci artificiales de Ig poseen la capacidad de soportar reordenación génica (si los segmentos génicos no están completamente reordenados) en el animal en cuestión, produciendo con ello una colección diversificada de inmunoglobulinas que poseen idiotipos humanos.

Los elementos reguladores tales como promotores, intensificadores, regiones interruptoras, señales de recombinación, y semejantes, pueden tener origen humano o no humano. Lo que se requiere es que los elementos sean capaces de operar en las especies animales de interés, con objeto de proporcionar los loci artificiales funcionales.

En un aspecto, la invención proporciona construcciones transgénicas que contienen un locus artificial de cadena pesada capaz de soportar reordenación génica en el animal hospedador y producir con ello una colección diversificada de cadenas pesadas que poseen idiotipos humanos. Un locus artificial de una cadena pesada del transgeno contiene una región V con al menos un segmento de gen V humano. Preferiblemente, la región V incluye al menos aproximadamente 5-100 segmentos de genes V de cadenas pesadas (o "VH") humanos. Como se ha descrito anteriormente, un segmento VH humano incluye secuencias naturales de un segmento génico VH humano, formas degeneradas de secuencias naturales de un segmento génico VH humano, así como secuencias sintéticas que codifican una secuencia polipeptídica sustancialmente idéntica (es decir, al menos 85%-95% aproximadamente) a la de un polipéptido del dominio V de una cadena pesada humana.

10 En una realización preferida, el locus artificial de cadena pesada contiene al menos uno o varios genes de región constante de la rata, por ejemplo, C δ , C μ y C γ (incluyendo cualquiera de las subclases de C γ)

En otra realización preferida, el locus artificial de cadena pesada contiene genes artificiales de región constante. En una realización preferida tales genes artificiales de región constante codifican un dominio CH1 humano y los dominios CH2 CH3 de la rata, o un dominio CH1 humano y los dominios CH2, CH3 y CH4 de la rata. Una cadena pesada híbrida con un dominio CH1 humano se empareja eficazmente con una cadena ligera totalmente humana.

15 En otra realización preferida, el locus artificial de cadena pesada contiene genes artificiales de región constante que carecen de los dominios CH1. En una realización preferida, tales genes artificiales de región constante codifican IgM y/o IgG truncadas que carecen del dominio CH1 pero que comprenden los dominios CH2 y CH3, o CH1, CH2, CH3 y CH4. Las cadenas pesadas que carecen de los dominios CH1 no pueden emparejarse eficazmente con cadenas ligeras de Ig, y forman anticuerpos de cadenas pesadas solamente.

En otro aspecto, la invención proporciona construcciones transgénicas que contienen un locus artificial de cadena ligera, capaces de soportar reordenación génica en el animal hospedador produciendo con ello una colección diversificada de cadenas ligeras que poseen idiotipos humanos. Un locus artificial de cadena ligera del transgeno contiene una región V con al menos un segmento de gen V humano, por ejemplo, una región V que tiene al menos un gen VL humano y/o al menos un segmento VJ humano reordenado. Preferiblemente, la región V incluye al menos, aproximadamente, 5-100 segmentos de gen V (o "VL") de cadena ligera humana. Consecuentemente, un segmento VL humano engloba secuencias naturales de un segmento de gen VL humano, formas degeneradas de secuencias naturales de un segmento de gen VL humano, así como secuencias sintéticas que codifican una secuencia polipeptídica sustancialmente idéntica (es decir, al menos aproximadamente 85%-95%) a la de un polipéptido del dominio V de una cadena ligera humana. En una realización el locus artificial de cadena ligera de Ig tiene una región C que posee al menos un gen C de la rata (por ejemplo, C λ o C κ de la rata).

Otro aspecto de la presente invención está dirigido a métodos de obtención de un vector transgénico que contiene un locus artificial de Ig. Tales métodos implican aislar loci de Ig o sus fragmentos, y combinarlos con uno o varios fragmentos de DNA que comprenden secuencias que codifican elementos de regiones V humanas. El segmento o segmentos génicos de Ig son insertados en el locus artificial de Ig o una de sus partes, por ligación o recombinación homóloga de modo que retienen la capacidad del locus para soportar una reordenación génica eficaz en el animal en cuestión.

Preferiblemente, se aísla un locus de Ig no humana explorando una colección de plásmidos, cósmidos, YACs o BACs, y semejantes, preparada a partir del DNA genómico de los mismos. Los clones de YAC pueden transportar fragmentos de DNA de hasta 2 megabases, y por tanto un locus entero de una cadena pesada animal o una parte grande del mismo, puede ser aislada en un clon de YAC, o reconstruida para estar contenido en un clon de YAC. Los clones de BAC son capaces de llevar fragmentos de DNA de menor tamaño (aproximadamente 50-500 kb). No obstante, muchos clones de BAC que contienen fragmentos de un locus de Ig que se solapan, pueden ser alterados por separado e inyectados seguidamente juntos en una célula receptora animal., en la que los fragmentos que se solapan se recombinan en la célula animal receptora generando un locus continuo de Ig.

Segmentos génicos de Ig humana pueden ser integrados en el locus de Ig sobre un vector (por ejemplo un clon de BAC) mediante una diversidad de métodos, que incluyen ligación de fragmentos de DNA o inserción de fragmentos de DNA por recombinación homóloga. La integración de los segmentos génicos de Ig humana se efectúa de modo que el segmento génico de Ig humana esté ligado de modo operable a la secuencia del animal hospedador existente en el transgeno produciendo un locus de Ig humanizado, funcional, es decir, un locus de Ig capaz de reordenación génica, lo que lleva a la producción de una colección diversificada de anticuerpos con idiotipos humanos. La recombinación homóloga puede llevarse a cabo en bacterias, levaduras y otras células con una frecuencia alta de acontecimientos de recombinación homóloga. Los YACs y BACs obtenidos pueden aislarse fácilmente desde las células y usarse para producir animales transgénicos.

55 *Inmunoglobulinas que poseen un idiotipo humano*

Una vez obtenido un animal transgénico capaz de producir inmunoglobulinas que poseen un idiotipo humano, pueden obtenerse fácilmente preparaciones de inmunoglobulinas y anticuerpos contra un antígeno, inmunizando el

animal con el antígeno. "Composición de antisueros policlonales" tal como se usa en esta memoria, incluye preparaciones de anticuerpos policlonales purificadas por afinidad-

5 Puede usarse una diversidad de antígenos para inmunizar a un animal transgénico. Tales antígenos incluyen, aun cuando no se limita a ellos, microorganismos, por ejemplo virus y organismos unicelulares (tales como bacterias y hongos) vivos, atenuados o muertos, fragmentos de los microorganismos, o moléculas antigénicas aisladas desde los microorganismos.

10 Los antígenos bacterianos preferidos para emplear para inmunizar un animal, incluyen antígenos purificados procedentes de *Staphylococcus aureus* tales como polisacáridos capsulares de tipo 5 y 8, versiones recombinantes de factores de virulencia tales como alfa-toxina, proteínas de unión de adhesina, proteínas de unión de colágeno, y proteínas de unión de fibronectina. Los antígenos bacterianos preferidos incluyen también una versión atenuada de *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, enterococos, enterobacteriaceas, y *Klebsiella pneumoniae*, o sobrenadantes de cultivos de estas células bacterianas. Otros antígenos bacterianos que pueden ser empleados para la inmunización incluyen un lipopolisacárido (LPS) purificado, antígenos capsulares, polisacáridos capsulares y/o versiones recombinantes de las proteínas de la membrana externa, proteínas de unión de fibronectina, endotoxinas y exotoxinas procedentes de *Pseudomonas aeruginosa*, enterococos, enterobacteriaceas y *Klebsiella pneumoniae*.

15 Los antígenos preferidos para generar anticuerpos contra hongos, incluyen versiones atenuadas de hongos o de sus proteínas de la membrana externa, cuyos hongos incluyen, aun cuando no se limita a ellos, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Cryptococcus neoformans*.

20 Los antígenos preferidos para emplear en la inmunización con objeto de generar anticuerpos contra virus, incluyen las proteínas de envoltura y versiones atenuadas de virus que incluyen, aun cuando no se limita a ellos, el virus sincitial respiratorio (RSV) (en particular la proteína F), el virus de la hepatitis C (HCV), el virus de la hepatitis B (HBV), citomegalovirus (CMV), EBV y HSV.

25 Pueden generarse anticuerpos específicos para el cáncer inmunizando animales transgénicos con células tumorales aisladas o líneas de células tumorales aisladas, así como también antígenos asociados a tumores que incluyen, aun cuando no se limita a ellos, el antígeno Her-2-neu (anticuerpos contra el cual son útiles para el tratamiento del cáncer de mama); los antígenos CD20, CD22 y CD53 (anticuerpos contra los cuales son útiles para el tratamiento de linfomas de células B), el antígeno de membrana específico de la próstata (PMSA) (anticuerpos contra el cual son útiles para el tratamiento del cáncer de próstata) y la molécula 17-1A (anticuerpos contra la cual son útiles para el tratamiento del cáncer de colon).

30 Los antígenos pueden ser administrados a un animal transgénico de cualquier modo conveniente, con o sin un adyuvante, y pueden ser administrados según un plan previamente determinado.

35 Para la obtención de un anticuerpo monoclonal, se aíslan células esplénicas desde el animal transgénico inmunizado y se usan o bien en una fusión celular con líneas celulares transformadas para producir hibridomas, o bien cDNAs que codifican anticuerpos son clonados mediante técnicas estándar de biología molecular y expresados en células transfectadas. Los procedimientos operatorios de obtención de anticuerpos monoclonales están bien establecidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, la solicitud de patente europea 0 583 980 A1 ("Método para generar anticuerpos monoclonales a partir de conejos"), la patente de EE.UU. No. 4.977.081 ("Hibridomas estables de conejo-ratón y sus productos de secreción") el documento WO 97/16537 ("Línea estable de células B del pollo, y método de uso de la misma"), y el documento EP 0 491 057 B1 ("Hibridoma que produce inmunoglobulina G específica de las aves"). La producción in vitro de anticuerpos monoclonales partiendo de moléculas de cDNA clonadas ha sido descrita por Andris-Widhopf et al., "Métodos para generar fragmentos de anticuerpos monoclonales del pollo mediante presentación de fago". J. Immunol. Methods 242:159 (2000), y por Burton, D.R., "Presentación de fago", Immunotechnology 1:87 (1995).

45 Una vez que han sido generados anticuerpos monoclonales quiméricos con idiotipos humanos, tales anticuerpos quiméricos pueden ser convertidos fácilmente en anticuerpos totalmente humanos usando técnicas estándar de biología molecular. Los anticuerpos monoclonales totalmente humanos no son inmunógenos en los seres humanos y son apropiados para usar en el tratamiento terapéutico de seres humanos.

Anticuerpos de la invención que incluyen anticuerpos de cadenas pesadas solamente

50 En una realización, animales transgénicos que carecen de un locus funcional de cadena ligera de Ig, y que comprenden un locus artificial de cadena pesada, son inmunizados con un antígeno para producir anticuerpos de cadenas pesadas solamente que se unen específicamente al antígeno.

55 En una realización, la invención proporciona células que producen anticuerpos monoclonales derivadas de tales animales, así como también ácidos nucleicos derivados desde ellas. También se proporcionan hibridomas derivados desde ellas. También se proporcionan anticuerpos de cadenas pesadas solamente, totalmente humanos, así como ácidos nucleicos codificantes, derivados desde tales hibridomas.

En la técnica se encuentran enseñanzas sobre anticuerpos de cadenas pesadas solamente. Por ejemplo, véanse las publicaciones PCT de los documentos WO02085944, WO02085945, WO2006008548 y WO2007096779. Véanse también las patentes US 5.840.526; US 5.874.541; US 6.005.079; US 6.765.087; US 5.800.988; EP 1589107; WO 9734103 y US 6.015.695.

5 *Composiciones farmacéuticas*

En una realización adicional de la presente invención, se mezclan anticuerpos monoclonales o policlonales purificados, con un excipiente farmacéutico apropiado, adecuado para administrar a pacientes, para preparar composiciones farmacéuticas.

10 Los pacientes tratados con las composiciones farmacéuticas de la invención son, preferiblemente, mamíferos y, más preferiblemente, seres humanos, aun cuando también se contemplan usos veterinarios.

15 Los excipientes farmacéuticamente aceptables que pueden ser empleados en las presentes composiciones farmacéuticas, pueden ser cualesquiera disolventes, medios de dispersión, agentes de isotonicidad y semejantes. Excepto en el caso, como con cualquier medio convencional, agente, diluyente o vehículo, en que sea perjudicial para el receptor o para la eficacia terapéutica de los anticuerpos contenidos en ellas, su uso en las composiciones farmacéuticas de la presente invención es apropiado.

El excipiente puede ser líquido, semisólido, por ejemplo, pastas, o excipientes sólidos. Como ejemplos de excipientes se incluyen aceites, agua, soluciones salinas, alcohol, azúcar, geles, lípidos, liposomas, resinas, matrices porosas, aglutinantes, materiales de carga, revestimientos, agentes conservantes y semejantes, o sus combinaciones.

20 *Métodos de tratamiento*

También se describen métodos para tratar una enfermedad de un vertebrado, preferiblemente un mamífero, preferiblemente un primate, siendo los seres humanos una realización especialmente preferida, mediante la administración de una composición de anticuerpos purificados de la invención, deseable para tratar tal enfermedad.

25 Las composiciones de anticuerpos pueden ser usadas para unirse y neutralizar o modular una entidad antigénica existente en tejidos del cuerpo humano, que ocasiona o contribuye a una enfermedad o que provoca respuestas inmunitarias no deseadas o anormales. Se define en esta memoria una "entidad antigénica" englobando cualesquiera moléculas solubles o moléculas unidas de la superficie celular, con inclusión de proteínas, así como también células u organismos o agentes causantes de enfermedades infecciosas, que son al menos capaces de unirse a un anticuerpo y, preferiblemente, son capaces también de estimular una respuesta inmunitaria.

30 La administración de una composición de anticuerpos contra un agente infeccioso como monoterapia o en combinación con quimioterapia, da por resultado la eliminación de partículas infecciosas. Una administración única de anticuerpos hace disminuir, generalmente, el número de partículas infecciosas 10 a 100 veces, más comúnmente, más de 1000 veces. De modo semejante, la terapia con anticuerpos en pacientes con una enfermedad maligna, empleada como monoterapia o en combinación con quimioterapia, reduce generalmente el número de
35 células malignas 10 a 100 veces o más de 1000 veces. El tratamiento terapéutico puede repetirse durante un período extendido de tiempo para asegurar la eliminación completa de las partículas infecciosas, células malignas, etc. En algunos casos el tratamiento terapéutico con preparados de anticuerpos puede continuarse durante períodos extendidos de tiempo en ausencia de cantidades detectables de partículas infecciosas o células indeseables.

40 De modo semejante, el uso de terapia con anticuerpos para modular respuestas inmunitarias puede consistir en una sola administración o en múltiples administraciones de anticuerpos terapéuticos. El tratamiento terapéutico puede continuarse durante períodos prolongados de tiempo en ausencia de síntomas de la enfermedad.

45 El tratamiento en cuestión puede ser empleado en conjunción con quimioterapia en dosis suficientes para inhibir la enfermedad infecciosa o las malignidades. En pacientes con enfermedades autoinmunitarias o receptores de trasplantes, el tratamiento terapéutico con anticuerpos pueden ser empleado en conjunción con un tratamiento terapéutico inmunosupresor en dosis suficientes para inhibir las reacciones inmunitarias.

Experimental

Evolución directa de endonucleasas buscadoras de blancos, específicas para secuencias de inmunoglobulinas de la rata

50 Un análisis de secuencias de exones de IgM de la rata dio como resultado la identificación de varias secuencias de escisión dianas de endonucleasas buscadoras de blancos construidas. Usando la endonucleasa buscadora de blancos I-SceI, fueron identificadas dos secuencias diana, una dentro del exón II de IgM de la rata (CGTGGATCACAGGGGTCT) y la otra dentro del exón III de IgM de la rata (CTGGGATAACAGGAAGGA). Estos sitios comparten una identidad de secuencias de 61% (11 de 18 bases) con la secuencia natural de reconocimiento de la I-SceI (TAGGGATAACAGGGTAAT)

Tabla 1. Secuencias diana en exones de IgM de la rata (los nucleótidos diferentes están subrayados)

Diana	Secuencia	Semejanza	Posición
T3	<u>CGTGGATCACAGGGGTCT</u>	61%	Exón II
T4	<u>CTGGGATAACAGGAAGGA</u>	61%	Exón III
Tipo salvaje	TAGGGATAACAGGGTAAT	-----	-----

Para la construcción de endonucleasas buscadoras de blancos, específicas para estas secuencias diana, los inventores usaron una selección altamente sensible para el desarrollo dirigido de endonucleasas buscadoras de blancos que asocia la escisión enzimática de DNA con la supervivencia de células huésped (descrito con detalle por Chen y Zhao. Nucleic Acid Research 33(18):e154, 2005). Se usó una estrategia de desarrollo conjunto in vitro para construir variantes de I-SceI con especificidad de secuencias diana. Como ilustra la Tabla 2, para la secuencia diana T3, dos nuevas secuencias, T3i1 y T3i2, fueron seleccionadas como secuencias intermedias, mientras que para la secuencia diana T4, dos nuevas secuencias, T4i1 y T4i2 fueron seleccionadas como secuencias intermedias. Las secuencias T3i1 y T4i1 fueron clonadas en el plásmido informador obteniendo p11-LacY-T3i1 y p11-LacY-T4i1, respectivamente.

Tabla 2. Secuencias de tres etapas (los diferentes nucleótidos están subrayados)

Etapa 1	T3i1	<u>TAGGGATAACAGGGGTCT</u>	T4i1	<u>TAGGGATAACAGGGAGGA</u>
Etapa 2	T3i2	<u>CGTGGATAACAGGGGTCT</u>	T4i2	<u>CTGGGATAACAGGAAGGA</u>
Etapa 3	T3	<u>CGTGGATCACAGGGGTCT</u>	T4	<u>CTGGGATAACAGGAAGGA</u>

Para obtener mutantes de I-SceI con especificidad de las secuencias T3i1 ó T4i1 se llevó a cabo primeramente el establecimiento de un modelo molecular para identificar los restos a usar para crear una colección enfocada a ello mediante mutagénesis de saturación. Como ilustra la Figura 2, I-SceI se une al extremo 3' de T3i1 ó T4i1 mediante un lazo relajado que está situado en el surco menor del DNA. Los restos Gly13, Pro14, Asn15 y Lys 20 están próximos a este extremo 3' y el resto Asn 15 está unido directamente por puentes de hidrógeno a la última timina situada en el extremo 3' de la secuencia de reconocimiento de tipo salvaje. Se construyó una colección de mutantes mediante mutagénesis de saturación, que contenía todas las combinaciones posibles de sustituciones de aminoácidos en estos cuatro restos seleccionados. Para generar una colección suficientemente grande, la reacción de ligación y los procedimientos operatorios de transformación del DNA fueron optimizados mediante varios ensayos. Se creó una colección que consistía en $2,9 \cdot 10^6$ mutantes

La colección fue examinada en varias rondas de exploración para seleccionar mutantes de I-SceI con actividad aumentada hacia la secuencia T3i1. En comparación con la ronda 0 (I-SceI de tipo salvaje), la primera ronda de exploración proporcionó mutantes con actividad aumentada hacia la secuencia T3i1 dado que el grado de supervivencia de las células había aumentado 10 veces. El enriquecimiento de los mutantes potencialmente positivos en las rondas de exploración 2 y 3 mostró una mejoría adicional en el grado de supervivencia de las células. De modo semejante, la colección de mutantes fue explorada para seleccionar mutantes de I-SceI con actividad aumentada hacia la secuencia T4i1. La exploración proporcionó mutantes con actividad aumentada hacia la secuencia T4i1.

En paralelo, se diseñó una segunda colección de mutantes de I-SceI que incidían en el extremo 5' de la secuencia de reconocimiento. La primera colección creada usando mutagénesis de saturación fue enfocada sobre aquellos restos que interactúan con el extremo 3' de los cuatro nucleótidos de la secuencia de reconocimiento de I-SceI. Basado en modelos moleculares los restos Trp149, Asp150, Tyr 151 y Asn 152 se encuentran en el surco mayor formado por los nucleótidos del extremo 5'. El resto Asn152 interactúa directamente con el T(-7) a través de un puente de hidrógeno. Los restos Asp150 y Tyr152 interactúan indirectamente con el T opuesto a A(-6) por medio de una molécula de agua. Los restos Trp149 y Tyr151 interactúan con la cadena principal de fosfato. Por tanto, estos cuatro restos son importantes para la especificidad de secuencia de I-SceI y se llevó a cabo una mutagénesis de saturación simultánea sobre estos cuatro restos para crear una segunda colección de mutantes de I-SceI.

El desarrollo conjunto posterior de estas enzimas dio por resultado la generación de nuevas meganucleasas específicas de secuencias diana existentes en los exones II y III de IgM de la rata (CGTGGATCACAGGGGTCT y CTGGGATAACAGGAAGGA).

Construcción de I-Crel con especificidad de secuencia definida

Para la construcción de endonucleasas buscadoras de blancos, específicas para nuevas secuencias diana, los inventores usaron una selección altamente sensible para el desarrollo dirigido de endonucleasas buscadoras de blanco que asociaran la escisión enzimática de DNA con la supervivencia de las células huésped (descrito con

detalle por Chen y Zhao, Nucleic Acid Research, 33(18):e154, 2005). Además, se diseñó una estrategia general para construir mutantes de I-Crel con especificidad de secuencia definida. I-Crel reconoce una secuencia diana de un modo pseudopalindrómico. Las bases palindrómicas son reconocidas directamente por I-Crel y puede ser difícil que sean alteradas (J. Mol. Biol., 280, 345-353) (Fig. 4)

- 5 Esta propiedad impide la construcción directa de derivados de I-Crel que reconocen una secuencia no palindrómica. Para superar este problema, la secuencia diana fue dividida en mitad izquierda (mitad aguas arriba) y mitad derecha (mitad aguas abajo). I-Crel está optimizada para las secuencia intermedias del palíndrome de la mitad izquierda y el palíndrome de la mitad derecha, respectivamente (Figura 4). Después, se construyen mutantes de I-Crel, optimizados para secuencias intermedias, para reconocer el palíndrome de la secuencia diana. Finalmente, el mutante de I-Crel optimizado, respectivamente, para la mitad izquierda y el optimizado para la mitad derecha, puede ser coexpresado para escindir la secuencia diana. Además, se examina la fusión del mutante optimizado de la mitad izquierda con el mutante optimizado de la mitad derecha mediante un engarce polipeptídico.

- 15 Se identificó una secuencia diana dentro del exón IV (CAACTGATCCTGAGGGAGTCCG) que comparte una identidad de secuencia de 59% con la secuencia natural de reconocimiento de la endonucleasa buscadora de blancos I-Crel. Seguidamente, basándose en la identidad de bases palindrómicas dentro de la secuencia diana original de I-Crel, fueron seleccionadas dos secuencias, T5 y T6, como secuencias diana para construir I-Crel.

Secuencia de reconocimiento de I-Crel y 2 secuencias diana

	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
	Primera mitad											Segunda mitad												
	A					B						C					D						Homología	
Original	C	A	A	A	A	C	G	T	C	G	T	G	A	G	A	G	A	G	T	T	G	G	Total Palindrómica	
T5	A	A	A	A	A	A	T	G	T	C	C	T	T	G	A	A	G	G	T	T	G	A	G	50,0% 64,3%
T6	C	A	A	C	T	G	A	T	C	C	T	G	A	G	G	G	A	G	T	C	G	G	59,1% 57,1%	

Las bases palindrómicas están resaltadas. Las bases conservadas están escritas en negrita

- 20 Las dos secuencias diana T5 y T6, fueron clonadas en plásmidos informadores. El gen de I-Crei fue clonado en el plásmido pTrc y secuenciado para confirmar que no se habían introducido mutaciones durante la amplificación por PCR. El sistema de selección de I-Crei se evalúa para determinar los grados de supervivencia de las células.

Por otra parte, se llevó a cabo el establecimiento de modelos moleculares y fueron identificados restos de proteínas que contactan directamente con el sustrato de DNA. Además, los inventores presentes diseñaron las secuencias intermedias para realizar experimentos in vitro de desarrollo conjunto

- 25 Restos diana para mutagénesis de saturación

	Resto diana	Resto diana
YN-TS5-L	Q26 y S32	YN-TS6-L Q26, K28 y R68
YN-TS5-Ri1	R68, R70 y D75	YN-TS6-Ri1 Q44 y R68
YN-TS5-Ri2	Q26 y K28	YN-TS6-Ri2 N30, Y33 y Q38
YN-TS5-Ri3	N30, Y33 y Q38	

Seguidamente, son generadas colecciones de mutantes de I-Crel y exploradas para determinar derivados de I-Crel con nuevas secuencias diana. El desarrollo conjunto posterior de estas enzimas da por resultado la generación de nuevas meganucleasas específicas para una secuencia diana dentro del exón IV de IgM de la rata (CAACTGATCCTGAGGGAGTCCG)

- 30 *Construcción de nucleasas de dedo de cinc*

Se diseñaron proteínas de dedo de cinc (ZFP) contra secuencias que codifican IgM de la rata (exones 1-4) y se unieron según ha sido descrito (Zhang L. et al. Acción de un factor de transcripción de dedo de cinc sintético en un sitio cromosómico endógeno. Activación del gen de eritropoyetina humana. J. Biol. Chem. 275:33850-33860, 2000, y Liu, P.Q. et al. Regulación de un locus endógeno contra un grupo de proteínas de dedo de cinc diseñadas, dirigidas a regiones de cromatina accesibles. Activación de factor de crecimiento endotelial vascular. J. Biol. Chem. 276:11323-11334, 2001), obteniendo los restos de ZFP que siguen.

SBS	Secuencia de reconocimiento	Dedo 1	Dedo 2	Dedo 3	Dedo 4	Dedo 5	Dedo 6	Engarce 2-3	Engarce 4-5
17063	AGACAGGGGGCTCTC	NKVGLIE	TSSDLSR	RSDHLSR	RSDNLSE	QNAHRKT		TGGERP	TGEKP
17065	AATTTGGTGGCCATG	RSDALST	DRSTRTK	RSDALAR	RSDSLSA	TSSNRKT		TGGQRP	TGEKP
17067	GTTCTGGTAGTT	RSANLAR	RSDNLRE	TSGLSR	QSGSLTR	RSDVLSE		TGGGGSQRP	TGSQKP
17068	GAAGTCATGCAGGGTGTC	DRSALSR	TSGHLSR	RSDNLST	HNATRIN	DRSALSR	TSGSLTR	TGGQRP	TGSQKP
17089	GGTGCCATTGGGGTG	RSDALAR	RSDHLST	HSNARKN	ERGTAR	TSGHLSR	QSGNLAR	TGEKP	TGSQKP
17090	GCTGTGGGTGGGCT	QSSDLSR	RSDALTQ	TSGHLSR	RSDALSR	DRSDLSR		TGGQRP	TGEKP
17119	ACCATGTGTGGCAGGG	RSAHLSR	QSGDLTR	RSDALAR	RSDTLSV	DNSTRIK		TGEKP	TGEKP
17120	GAGGACCGTGGACAAG	RSANLSV	DRANLSR	RSDALAR	DRSDLSR	RSDDLTR		TGEKP	TGEKP

DNA que codifica ZPFs fue clonado en un vector de expresión. Se obtuvieron células C6 de la rata de American Type Culture Collection y se cultivaron, según está recomendado, en medio F-12 (Invitrogen) suplementado con suero fetal de ternera cualificado, al 5% (FCS, Hyclone), suero de caballo al 15% (Invitrogen) y glutamina 5 mM. Las células fueron desprendidas de las placas de plástico usando la proteasa TrypLE Select (Invitrogen). Para realizar la transfección, 200.000 células C6 fueron mezcladas con 400 ng de DNA plasmídico y 20 μ l de Amaxa Solution SF. Las células fueron transfectadas en un Amaxa Nucleofector II Shuttle usando el programa 96 FF-137 y recuperadas en 0,1 litro de medio F-12 suplementado, moderadamente caliente. Tres y nueve días después de la transfección las células fueron recolectadas y se preparó DNA cromosómico usando un Quick Extract Solution 1.0 (Epicentre). La región apropiada del locus de IgM fue amplificada por PCR usando DNA polimerasa de alta fidelidad Accuprime (Invitrogen). Las mezclas para realizar la reacción de PCR fueron calentadas a 94° y luego enfriadas gradualmente hasta la temperatura ambiente. Aproximadamente 200 ng del DNA reasociado fueron mezclados con 0,33 μ l de enzima CEL-1 (Transgenomic) e incubados durante 20 minutos a 42°. Los productos de reacción fueron analizados por electroforesis en gel de poli(acrilamida), en una solución tampón de Tris-borato-EDTA 1X. Un ejemplo típico que demuestra la actividad de escisión se muestra en la Figura 6

15 *Generación de ratas con locus endógeno de cadenas pesadas inactivado, usando plásmidos de expresión que codifican una meganucleasa*

Una secuencia de cDNA que codifica una meganucleasa específica para un exón C μ de la rata, es clonada en un vector de expresión donde la expresión es controlada por la secuencia de operador de tetraciclina. El DNA plasmídico es linearizado por digestión con enzimas de restricción y purificado. Oocitos de rata son fertilizados con esperma procedente de ratas con un transgenio que codifica un transactivador invertido que responde a la tetraciclina. El DNA plasmídico purificado es inyectado en pronúcleos de tales oocitos de rata fertilizados. Seguidamente, embriones de rata son transferidos a madres adoptivas y llevados a término. Los recién nacidos son analizados por PCR para detectar la presencia de transgenio que codifica meganucleasa, usando DNA aislado desde muestras de tejidos. Animales fundadores transgénicos, machos, son alojados durante cuatro meses en que alcanzan la madurez sexual. La expresión de meganucleasa en animales transgénicos es inducida mediante la administración diaria de doxiciclina durante uno a siete días. Seguidamente, se recoge esperma dos veces por semana y se analiza por PCR. Para la crianza se emplean los animales macho que producen la esperma mutada. Los descendientes con C μ de la rata mutado son identificados por análisis de PCR de muestras de tejidos.

30 *Generación de ratas con locus endógeno de cadenas pesadas inactivado, por microinyección de oocitos fertilizados con DNA plasmídico que codifica una meganucleasa específica.*

Una secuencia de cDNA que codifica una meganucleasa específica para un exón C μ de la rata, es clonada en un vector de expresión en que la expresión es controlada por el promotor CAG. DNA plasmídico purificado es inyectado en pronúcleos de oocitos de rata fertilizados. Seguidamente, son transferidos embriones de rata a madres adoptivas y llevados a término. Los recién nacidos son analizados mediante PCR y secuenciación directa, para detectar la presencia de exones de IgM mutados. Alternativamente, los animales que contienen células con exones de IgM mutados son identificados por incubación de productos de PCR, calentados y enfriados, con la enzima CEL-1 y subsiguiente electroforesis en gel.

La presente solicitud incluye ,además, la materia objeto de las cláusulas numeradas que siguen:

40 1. Un método para producir una célula germinal viable que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado, que comprende expresar al menos una meganucleasa en una célula germinal, oocito fertilizado o embrión, para generar una célula germinal viable que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado, en el que dicha meganucleasa reconoce una secuencia diana de meganucleasas presente en, o proximal a, dicho locus endógeno de Ig.

45 2. Un método para producir un animal transgénico que comprende al menos un locus endógeno de Ig inactivado, de línea germinal, que comprende derivar un animal transgénico desde una célula germinal viable que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado producida según el método de la cláusula 1, o uno de sus descendientes de la célula germinal, en el que dicho animal transgénico está seleccionado entre el grupo que consiste en aves, roedores y comadrejas.

50 3. El método según la cláusula 2, en el que dicha célula germinal viable que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado comprende, además, un locus artificial de Ig, por lo que dicho animal transgénico comprende un locus artificial de Ig.

55 4. El método según la cláusula 2, que comprende, además, introducir un locus artificial de Ig en dicha célula germinal viable que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado, o uno de sus descendientes de la célula germinal o un oocito fertilizado o un embrión derivado desde la misma, por lo que dicho animal transgénico comprende un locus artificial de Ig.

5. El método según la cláusula 2, en el que dicha derivación de un animal transgénico desde una célula germinal viable que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado, comprende combinar dicha célula

- germinal viable. o uno de sus descendientes de la célula germinal,, con un gameto que comprende un locus artificial de Ig, por lo que dicho animal transgénico comprende un locus artificial de Ig,
- 5 6. El método según una cualquiera de las cláusulas 3-5, en el que dicho locus artificial de Ig comprende: (i) una región V que posee al menos un segmento de gen V humano que codifica una línea germinal o una secuencia de aminoácidos de una región V humana hipermutada; (ii) uno o más segmentos de gen J; y (iii) uno o más segmentos génicos de región constante, en el que dicho locus artificial de Ig es funcional y capaz de soportar reordenación génica y producir una colección de inmunoglobulinas artificiales en un animal transgénico derivado desde dicha célula germinal.
7. El método según la cláusula 5, en el que dicho gameto tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado.
- 10 8. El método según la cláusula 1, en el que dicha secuencia diiana de meganucleasas esta prenete en, o proximal a, un segmento de gen J dentro de dicho al menos un locus endógeno de Ig.
9. El método según la cláusula 1, en el que dicha secuencia diana de meganucleasas esta prenete en, o proximal a, un gen de región constante de inmunoglobulina.
- 15 10. El método según la cláusula 1, que comprende, además, expresar una segunda meganucleasa en dicha célula germinal, oocito fertilizado o embrión, en el que dicha segunda meganucleasa reconoce una segunda secuencia diana de meganucleasas presente en, o proximal a, dicho locus endógeno de Ig.
- 20 11. El método según la cláusula 1, en el que dicha célula germinal, oocito fertilizado o embrión comprende una construcción genómica de expresión de meganucleasas que comprende una región de control de la expresión inducible ligado de modo operable a un ácido nucleico que codifica dicha meganucleasa, y en el que dicha meganucleasa es expresada en dicha célula germinal, oocito fertilizado o embrión, por inducción de la expresión de dicha construcción genómica de expresión de meganucleasas.
12. El método según la cláusula 11, que comprende repetir la etapa de inducción de la expresión de dicha construcción genómica de expresión de meganucleasas.
- 25 13. El método según la cláusula 11, en el que dicha célula germinal, oocito fertilizado o embrión comprende una segunda construcción genómica de expresión de una meganucleasa que comprende una segunda región de control de la expresión. inducible, ligada de modo operable a un ácido nucleico que codifica una segunda meganucleasa, en el que dicha segunda meganucleasa codificada reconoce una segunda secuencia diana de meganucleasas presente en dicho locus endógeno de Ig, en el que dicho método comprende, además, inducir la expresión de dicho ácido nucleico que codifica una segunda meganucleasa, en dicha célula germinal, oocito fertilizado o embrión.
- 30 14. Una célula germinal viable que tiene al menos un locus endógeno de Ig inactivado, producida por el método según la cláusula 1.
15. Un animal transgénico producido por el método según la cláusula 2
16. Un animal transgénico por el método según una cualquiera de las cláusulas 3-5.
- 35 17. El animal transgénico según la cláusula 15 ó 16, en el que dicho animal transgénico carece de un locus endógeno funcional de cadena ligera de Ig.
18. El animal transgénico según las cláusulas 15 ó 16, en el que dicho animal transgénico carece de un locus endógeno funcional de cadena pesada de Ig.
- 40 19. El animal transgénico de la cláusula 16, en el que dicho animal transgénico es capaz de producir inmunoglobulinas que poseen un idiotipo humano.
20. El animal transgénico de la cláusula 16, en el que dicho animal transgénico carece de un locus funcional de cadena ligera de Ig y comprende un locus artificial de cadena pesada de Ig, y en el que dicho animal transgénico es capaz de producir anticuerpos de cadenas pesadas solamente.
- 45 21. El animal transgénico según la cláusula 16, en el que dicho animal transgénico comprende al menos un locus de cadena pesada de Ig con al menos un gen de región C que carece de secuencias que codifican un dominio CH1 funcional, y carece de un locus funcional de cadena ligera de Ig.
- 50 22. Un animal transgénico que comprende una construcción genómica de expresión de meganucleasas, en el que dicha construcción comprende una región de control de la expresión inducible, ligada de modo operable a un ácido nucleico que codifica una meganucleasa, y en el que dicha meganucleasa codificada reconoce una secuencia diana de meganucleasas presente en, o proximal a, un locus endógeno de Ig de dicho animal transgénico, en el que dicho animal transgénico está seleccionado entre el grupo que consiste en aves, roedores y comadrejas.

23. El animal transgénico de la cláusula 22, en el que el genoma de dicho animal transgénico comprende, además, al menos un locus artificial de Ig.
24. Un método para producir anticuerpos, que comprende inmunizar con un inmunógeno el animal transgénico según la cláusula 16
- 5 25. Una composición de antisueros policlonales producida por el método de la cláusula 24.
26. Un método para producir un anticuerpo monoclonal, que comprende (i) inmunizar con un inmunógeno el animal transgénico según la cláusula 16; (ii) aislar desde dicho animal transgénico una célula que produce anticuerpos monoclonales en el que dicha célula que produce anticuerpos monoclonales produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a dicho inmunógeno, y (iii) usar dicha célula que produce anticuerpos monoclonales para producir dicho anticuerpo monoclonal que se une específicamente a dicho inmunógeno, o usar dicha célula que produce anticuerpos monoclonales para producir una célula de hibridoma que produce dicho anticuerpo monoclonal y usar dicha célula de hibridoma para producir dicho anticuerpo monoclonal.
- 10
27. Un método para producir un anticuerpo monoclonal, que comprende: (i) inmunizar con un inmunógeno el animal transgénico según la cláusula 16; (ii) aislar desde dicho animal transgénico una célula que produce anticuerpos monoclonales en el que dicha célula que produce anticuerpos monoclonales produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a dicho inmunógeno; (iii) aislar desde dicha célula que produce anticuerpos monoclonales un ácido nucleico de anticuerpo monoclonal que codifica dicho anticuerpo monoclonal que se une específicamente a dicho inmunógeno; y (iv) usar dicho ácido nucleico de anticuerpo monoclonal para producir dicho anticuerpo monoclonal que se une específicamente a dicho inmunógeno.
- 15
28. El método según la cláusula 26 ó 27, en el que dicho anticuerpo monoclonal posee un idiotipo humano.
29. Un método para producir un anticuerpo monoclonal totalmente humano, que comprende: (i) inmunizar con un inmunógeno el animal transgénico según la cláusula 16; (ii) aislar desde dicho animal transgénico una célula que produce anticuerpos monoclonales en el que dicha célula que produce anticuerpos monoclonales produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a dicho inmunógeno; (iii) aislar desde dicha célula que produce anticuerpos monoclonales un ácido nucleico de anticuerpo monoclonal que codifica dicho anticuerpo monoclonal que se une específicamente a dicho inmunógeno; (iv) modificar dicho ácido nucleico de anticuerpo monoclonal para producir un ácido nucleico recombinante que codifica un anticuerpo monoclonal totalmente humano; y (v) usar dicho ácido nucleico recombinante que codifica un anticuerpo monoclonal totalmente humano para producir el anticuerpo monoclonal totalmente humano codificado.
- 25
30. Un anticuerpo monoclonal producido por el método según una cualquiera de las cláusulas 26, 27 ó 29.
- 30
31. Un método para neutralizar una entidad antigénica existente en un componente del cuerpo humano, cuyo método comprende poner en contacto dicho componente del cuerpo humano con una composición de antisueros policlonales según la cláusula 25, en el que dicha composición de antisueros policlonales comprende moléculas inmunoglobulina que se unen específicamente y neutralizan dicha entidad antigénica.
- 35
32. Un método para neutralizar una entidad antigénica existente en un componente del cuerpo humano, cuyo método comprende poner en contacto dicho componente del cuerpo humano con el anticuerpo monoclonal según la cláusula 30, en el que dicho anticuerpo monoclonal se une específicamente y neutraliza a dicha entidad antigénica.
- 40
33. Un método para producir anticuerpos de cadenas pesadas solamente, que comprende inmunizar un animal transgénico según la cláusula 20 ó 21.
34. Un anticuerpo de cadena pesada solamente, producido por el método según la cláusula 33.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método de generación de una rata, que comprende
- 5 (A) inyectar en una célula germinal de rata, oocito de rata fertilizado o un embrión de rata, una meganucleasa específica para fragmentos de gen de rata en loci de cadena pesada y/o ligera, endógenos a la rata, en el que la meganucleasa introduce roturas de dobles cadenas en dichos loci de cadena pesada y/o ligera; o (B) inyectar en una célula germinal de rata, oocito de rata fertilizado o un embrión de rata, un vector de expresión o ácido nucleico que codifica una meganucleasa específica para fragmentos de gen de Ig en loci de cadena pesada y/o ligera, endógenos a la rata, en el que la meganucleasa introduce roturas de dobles cadenas en dichos loci de cadena pesada y/o ligera.
- 10 2.- Una rata que es nulicigótica para loci endógenos de cadena ligera de Ig y/o loci endógenos de cadena pesada. .
- 3.- La rata según la reivindicación 2, que comprende un locus artificial de inmunoglobulina (Ig).
- 4.- La rata según la reivindicación 3, en la que el locus artificial de Ig es un locus de cadena ligera de Ig y/o un locus de cadena pesada de Ig.
- 15 5.- La rata según la reivindicación 3, en la que el locus artificial de Ig comprende un locus de Ig que comprende fragmentos de loci de Ig humano y de rata e incluyen múltiples segmentos de genes de inmunoglobulina, opcionalmente en la que: (i) al menos un segmento de gen (V) variable es un segmento de gen V humano; y/o (ii) al menos un segmento de gen (D) diverso es un segmento de gen D humano.
- 20 6.- La rata según la reivindicación 5, en la que el segmento génico humano comprende: (i) secuencias que suceden naturalmente, de un segmento génico de Ig humana; (ii) formas degeneradas de secuencias que suceden naturalmente, de un segmento génico de Ig humana; y/o (iii) secuencias sintéticas que codifican una secuencia polipeptídica que es 65%-85% idéntica al polipéptido codificado por una secuencia que sucede naturalmente, de un segmento génico de Ig humana
- 7.- La rata según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, que es capaz de producir inmunoglobulinas con idiotipos humanos.
- 25 8.- Un método para producir un anticuerpo monoclonal, que comprende: (i) inmunizar con un inmunógeno la rata según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6.; (ii) aislar desde la rata una célula que produce anticuerpos monoclonales en la que la célula que produce anticuerpos monoclonales produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno; y (iii) usar la célula que produce anticuerpos monoclonales para producir el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno, o usar la célula que produce anticuerpos monoclonales para producir una célula de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal y usar la célula de hibridoma para producir el anticuerpo monoclonal.
- 30 9.- Un método para producir un anticuerpo monoclonal, que comprende: (i) inmunizar con un inmunógeno la rata según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7; (ii) aislar desde la rata una célula que produce anticuerpos monoclonales en la que la célula que produce anticuerpos monoclonales produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno; (iii) aislar desde la célula que produce anticuerpos monoclonales un ácido nucleico de anticuerpo monoclonal que codifica el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno; y (iv) usar el ácido nucleico de anticuerpo monoclonal para producir el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno, en el que el anticuerpo monoclonal posee un idiotipo humano.
- 35 10.- Un método para producir un anticuerpo monoclonal, que comprende: (i) inmunizar con un inmunógeno la rata según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7; (ii) aislar desde la rata una célula que produce anticuerpos monoclonales en la que la célula que produce anticuerpos monoclonales produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno; (iii) aislar desde la célula que produce anticuerpos monoclonales un ácido nucleico de anticuerpo monoclonal que codifica el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno; (iv) modificar el ácido nucleico de anticuerpo monoclonal para producir un ácido nucleico recombinante que codifica un anticuerpo monoclonal totalmente humano; y (v) usar el ácido nucleico recombinante que codifica un anticuerpo monoclonal totalmente humano para producir el anticuerpo monoclonal totalmente humano codificado.
- 40 45 11.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el método comprende, además, la etapas de: i) purificar el anticuerpo; y ii) mezclar el anticuerpo con un excipiente farmacéutico apropiado adecuado para administración a pacientes.
- 50 12.- Una célula que puede obtenerse por el método según la reivindicación 8.
- 13.- Una célula transfectada que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo monoclonal definido en la reivindicación 9.
- 14.- La célula transfectada que comprende el ácido nucleico de anticuerpo monoclonal que codifica el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno según se define en la reivindicación 10

15.- Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo monoclonal que puede obtenerse por el método según la reivindicación 9, en el que el locus artificial comprende al menos un segmento de gen J humano, en el que el anticuerpo monoclonal es una inmunoglobulina quimérica que comprende una parte de una secuencia polipeptídica de inmunoglobulina humana, y una parte de una secuencia polipeptídica de inmunoglobulina de la rata.

5 16.- Una inmunoglobulina quimérica que comprende una secuencia polipeptídica codificada por el ácido nucleico según la reivindicación 15, en la que la inmunoglobulina quimérica comprende una parte de una secuencia polipeptídica de inmunoglobulina humana y una parte una secuencia polipeptídica de inmunoglobulina de la rata.

10 17.- La inmunoglobulina según la reivindicación 16, en la que la inmunoglobulina tiene una región constante (C) que está seleccionada entre: (i) una región constante C de la rata, o (ii) una región constante (C) artificial, en la que la región constante artificial está derivada desde regiones constantes humana y de la rata, opcionalmente en la que la región (C) artificial posee un dominio CH1 de IgG humana y dominios CH2 y CH3 de IgG de la rata.

18.- Una célula transfectada que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 15.

Figura 1



Figura 2. Interacción de I-SceI y DNA en el extremo 3' de la secuencia de reconocimiento

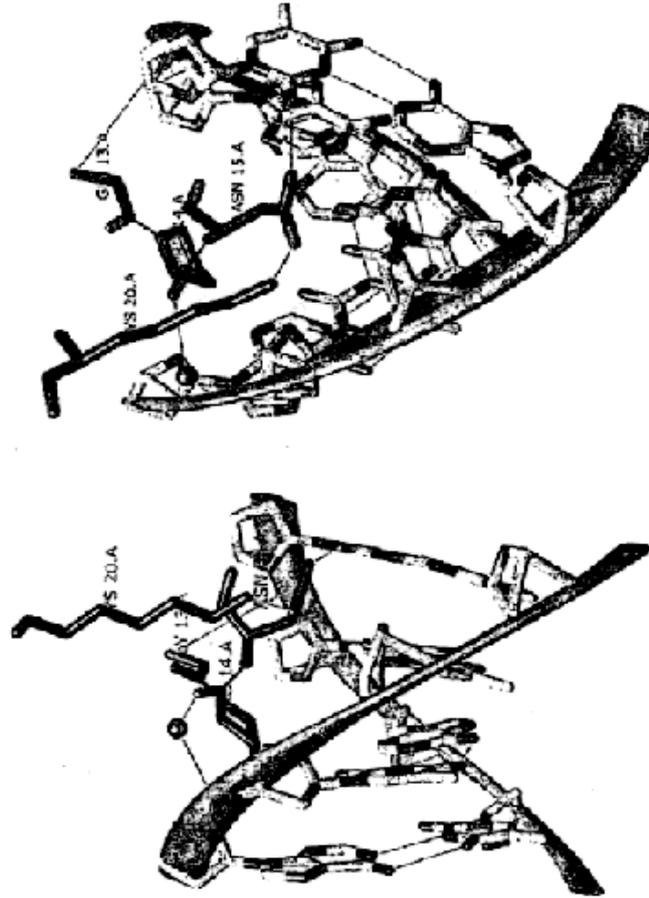


Figura 3. Interacción del extremo 5' de la secuencia de reconocimiento de I-SceI con I-SceI.



WT	<u>T</u> AGGGATACAGGGTAA <u>T</u>
T3	CGTGGAT <u>C</u> ACAGGGGTCT
T4	<u>C</u> TGGGATACAGGG <u>A</u> GGG

Figura 5. Diagrama esquemático de la estrategia para alterar la secuencia de reconocimiento de I-Crel

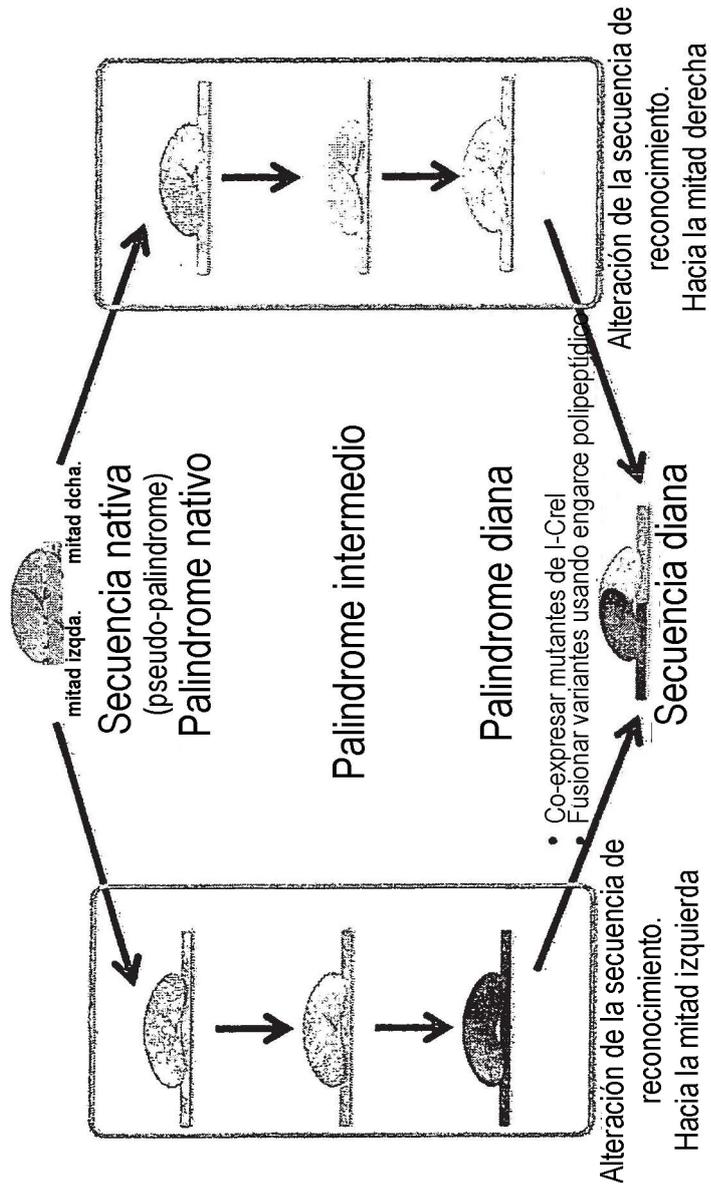


Figura 6

