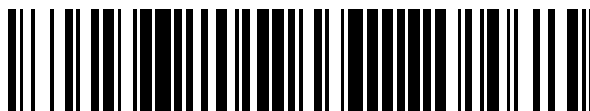


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 377**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2009 E 09824080 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 2348827**

54 Título: **Ungulados inmunodeprimidos**

30 Prioridad:

27.10.2008 US 108742 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.10.2015

73 Titular/es:

**REVIVICOR, INC. (100.0%)
1700 Kraft Drive Suite 2400
Blacksburg, VA 24060, US**

72 Inventor/es:

**AYARES, DAVID L.;
MENDICINO, MICHAEL;
WELLS, KEVIN y
DANDRO, AMY S.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 548 377 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).

Ungulados inmunodeprimidos**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

Se desvelan animales, en particular animales porcinos, tejido y órganos, además de células y líneas celulares derivadas de tales animales que carecen de expresión de inmunoglobulinas endógena funcional. Estos animales son útiles para el desarrollo de nuevos agentes farmacéuticos y biológicos. Además, se desvelan métodos para preparar

ANTECEDENTES

Se necesitan modelos para estudiar ciertas características de enfermedad. En la investigación de enfermedades infecciosas y el desarrollo de vacunas, es importante estudiar la respuesta inmunitaria celular y humoral, ambas juntas y por separado. Un informe de 2006 por la Organización Mundial de la Salud estableció "Hay evidencia que sugiere que tanto las respuestas inmunitarias celulares como humorales contribuyen a la protección en seres humanos, y así es necesario el desarrollo de métodos de laboratorio y modelos animales para la evaluación de nuevas vacunas/combinaciones de pertussis acelular que detecten ambos tipos de respuesta inmunitaria".

Los ratones son el modelo animal de investigación más comúnmente usado ya que son fáciles de mantener, se reproducen fácilmente y son menos caros de alojar y cuidar que modelos animales grandes. Además, la capacidad para modificar fácilmente genéticamente el genoma del ratón ha permitido la creación de muchas líneas de ratón con fenotipos específicos que son útiles para investigación (Malakoff, 2000). Hay numerosos modelos de ratón inmunodeficiente existentes.

Los ratones inmunodeficientes con mutaciones espontáneas se caracterizaron por primera vez en 1966-68 (*nude*) y 1983 (*scid*). La mutación *nude* produce un fallo de la mayoría de los linfocitos T para desarrollarse a partir de sus células precursoras tímicas, aunque están presentes algunos linfocitos T, linfocitos B y linfocitos NK. Por tanto, el ratón *nude* no es un ratón inmunológicamente inerte, aunque se ha usado ampliamente en investigación. Los ratones homocigóticos para la mutación *scid* (ratones SCID) no tienen linfocitos B o T, sin embargo tienen linfocitos NK. Además, frecuentemente tienen un fenotipo "con fugas" en el que se producen inmunoglobulinas (Bosma et al. (1989) Curr Top Microbiol Immunol 152, 1-263, Bosma & Carroll, (1991) Ann. Rev. Immunol. 9, 323-350). También se ha desarrollado un ratón deficiente en Rag-1 o Rag-2 (Mombaerts et al., (1992) Cell 68, 869-877, Shinkai, et al. (1992) Cell 68, 855-867, documento US 5859307). Los ratones deficientes en Rag-1 y Rag-2 no pueden iniciar el reordenamiento V(D)J y, por tanto, carecen de linfocitos maduros. Se han usado ratones mutantes SCID y nulos en Rag-1 y Rag-2 ampliamente en estudios con ratones atímicos deficientes en linfocitos T en protocolos de precondicionamiento, trasplante y exposición a patógenos.

Una forma de la que el cuerpo reacciona a antígenos es produciendo anticuerpos. Los anticuerpos (también llamados inmunoglobulinas o "Ig") son proteínas que se fabrican por los linfocitos B y circulan en la sangre para detectar antígenos extraños. Cuando un vertebrado se encuentra por primera vez con un antígeno, presenta una respuesta inmunitaria humoral primaria, en la que se activan linfocitos B, que generan anticuerpos altamente específicos para el antígeno y se diferencian en células "efectoras" para secretar los anticuerpos. Si el animal se encuentra con el mismo antígeno de nuevo después de un corto tiempo, la respuesta inmunitaria es más rápida y tiene una mayor magnitud que la primera respuesta. El encuentro inicial hace que ciertos linfocitos B proliferen y se diferencien. Los linfocitos de progenie incluyen no solo células efectoras, sino también células de memoria, que retienen la capacidad para producir células efectoras tras la posterior estimulación por el antígeno original. Las células efectoras viven durante solo algunos días, pero las células de memoria seguirán activas durante un periodo prolongado, incluso durante toda la vida del animal, y pueden ser reactivadas por una segunda estimulación con el mismo antígeno. Así, cuando se encuentran de nuevo con un antígeno, las células de memoria producen rápidamente células efectoras, que rápidamente producen anticuerpos.

Para examinar la función de los linfocitos B en respuestas inmunitarias, se han hecho ratones deficientes en linfocitos B por agotamiento de anticuerpos (Gordon, 1979), reconstitución de linfocitos T de ratones SCID (Ronchese y Hausmann, 1993; Sunshine et al., (1991) J Exp Med 174, 1653-1656), o por rotura genética del locus de Ig (Kitamura et al., (1991) Nature 350, 423-426; Jakobovits et al., (1993) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90, 2551-2555; Chen et al., (1993) Int Immunol 5, 647-656).

El uso de ratones deficientes en linfocitos B, en estudios paralelos con ratones no mutantes, ratones SCID, nulos en Rag-1 o Rag-2, ha permitido estudiar respuestas de linfocitos T (celulares) por separado de respuestas de linfocitos B (humorales) para muchas enfermedades. Por ejemplo, se han estudiado respuestas inmunitarias por ratones deficientes en linfocitos B para las enfermedades bacterianas Salmonella, Bordetella y tularemia (Ugrinovic et al., (2003) Infect Immun 71, 6808-6819, Leef et al., (2000) J Exp Med 191, 1841-1852, Chen et al., (2004) Microbial Pathogenesis 36, 311-318), la enfermedad viral de la viruela (Wyatt et al., (2004) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 4590-4595), las enfermedades parasitarias Leishmania

(Brown y Reiner, (1999) *Infect Immun* 67, 266-270, Miles et al., (2005) *J Exp Med* 201, 747-754, Ronet et al., (2008) *J Immunol* 180, 4825-4835.) y malaria (Weidanz et al., (2005) *Exp Parasitol* 111, 97-104), y para enfermedad inflamatoria del intestino (Ma et al., (1995) *J Exp Med* 182, 1567-1572). En realidad, los artículos que detallan la producción de tres líneas diferentes de ratones deficientes en linfocitos B Hc KO producidos en los años 90 (Kitamura et al., (1991) *Nature* 350, 423-426; Chen et al., (1993) *Int Immunol* 5, 647-656; Jakobovits et al., (1993) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 2551-2555) han sido citados hasta la fecha por más de 1000 publicaciones científicas (fuente: motor de búsqueda Google Scholar). Además de estudiar la respuesta inmunitaria básica a una exposición a patógeno, estos animales también se han usado para probar vacunas para eficacia (Wyatt et al., (2004) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 4590-4595). El uso de ratones transgénicos deficientes en linfocitos B también permitió la determinación de la función crítica para linfocitos B en el fenotipo de autoinmunidad sistémica asociada a lupus (Chan et al., (1999) *Immunol Rev* 169, 107-121).

Aunque los ratones se usan ampliamente, hay pocos ejemplos en la bibliografía del uso de otras especies como modelos animales inmunodeficientes para la investigación de enfermedades humanas. La mayoría de éstos son muy especializados en relación con el animal elegido y la enfermedad que se modela. Se han inmunosuprimido ratas por administración de dexametasona antes de la infección por *Aspergillus* para probar la eficacia de fármacos profilácticos (Ulmann et al., (2007) *J Antimicrob Chemother* 60, 1080-1084). Se utilizó un apéndice de conejo libre de gérmenes ligado para estudiar respuestas inflamatorias relacionadas con enfermedad inflamatoria del intestino (Shanmugam et al., (2005) *Inflamm Bowel Dis* 11, 992-996).

La publicación PCT N° WO06/047603 y las publicaciones de patente de EE.UU. relacionadas U.S. 2006/0130157 y U.S. 2008/0026457 describen cierta disposición de la secuencia de genes de la línea germinal de inmunoglobulina de ungulado, además de secuencias genómicas que codifican el sitio de la cadena pesada de inmunoglobulina de ungulado, y células, tejidos y animales ungulados que carecen de un alelo de un gen de inmunoglobulina de la cadena pesada o ligera nativa, y específicamente describen métodos de rotura dirigida de las secuencias de genes de Ig porcinos individuales, además de la sustitución con genes Ig humanos. Los animales genéticamente modificados resultantes se describen como útiles para producir anticuerpos policlonales humanos como terapéuticos.

Se han modificado genéticamente ratones para hacerlos modelos más apropiados para la infección con patógenos humanos. Por ejemplo, existen ligandos/receptores específicos de especie para infecciones tales como *Listeria*. Estos receptores se han introducido como transgenes en ratones. Estos ratones transgénicos expresan entonces el receptor y se vuelven huéspedes más susceptibles, ya que el patógeno puede unirse a su receptor conocido (que no está presente en ratones no mutantes) e inicia la infección (véase Lecuit y Cossart et al., (2002) *Trends Mol Med* 8, 537-542). Aunque tales modelos de ratón han demostrado ser útiles, los investigadores todavía insisten en que hay limitaciones técnicas, ya que los animales que normalmente desarrollan listeriosis no son animales de laboratorio clásicos tales como la rata o ratón, sino más bien animales de granja (Lecuit, (2007) *Microbes Infect* 9, 1216-1225).

Sigue existiendo la necesidad de un sistema de animal que pueda usarse eficazmente para modelar trastornos humanos, y en particular para modelar deficiencias inmunitarias. También sigue existiendo la necesidad de un modelo animal eficaz para desarrollar terapéuticos novedosos. Adicionalmente sigue existiendo la necesidad de un gran modelo animal para desarrollar y producir proteínas, en particular inmunoglobulinas humanas, sin contaminación endógena.

Es un objetivo de la invención proporcionar sistemas de animales mejorados para modelar trastornos humanos y para permitir la producción de ciertos agentes terapéuticos, particularmente ciertos agentes biológicos.

RESUMEN DE LA INVENCION

Sigue existiendo la necesidad de un modelo de animal grande verdadero que carezca de una respuesta inmunitaria humoral y que pueda modelar eficazmente patologías de enfermedad infecciosa humana.

La invención proporciona un método de probar la respuesta inmunitaria de un animal a un antígeno que comprende proveer un animal porcino genéticamente modificado que carece de expresión de la inmunoglobulina de la cadena pesada porcina funcional del antígeno y evaluar una respuesta del animal al antígeno, en el que el porcino tiene una alteración elegida como diana en ambos alelos de la región de unión J6 de la cadena pesada porcina, que produce una ausencia de producción de linfocitos B en el porcino.

La invención también proporciona un método de probar la utilidad de un profiláctico o terapéutico contra un agente infeccioso que comprende exponer un animal porcino genéticamente modificado que carece de expresión de la inmunoglobulina de la cadena pesada porcina funcional al agente infeccioso; tratar el porcino con el profiláctico o terapéutico; y evaluar la respuesta inmunitaria y evolución de la infección en el porcino; en el que el porcino tiene una alteración elegida como diana en ambos alelos de la región de unión J6 de la cadena pesada porcina que produce una ausencia de producción de linfocitos B en el porcino.

RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

En el presente documento se desvelan animales, en particular ungulados, y lo más particularmente cerdos, que carecen de producción de inmunoglobulina, métodos de producción de tales animales y usos de los mismos.

Se desvelan animales que carecen de expresión de un gen de inmunoglobulina nativo, que incluye expresar solo una versión no funcional de tal gen. Los animales pueden carecer de expresión de proteínas inmunoglobulinas nativas funcionales. Estos animales pueden presentar producción reducida, tener producción alterada o carecer de linfocitos B. Los animales pueden carecer de inmunoglobulinas nativas y carecer de linfocitos B. Los animales pueden carecer de o tener respuestas humorales alteradas o reducidas. El animal puede tener una alteración elegida como diana en un gen que codifica una cadena pesada en su genoma. El animal puede tener una alteración elegida como diana en un gen que codifica una región de unión de la cadena pesada en su genoma. El animal puede tener una alteración elegida como diana en ambos alelos de una región de unión de la cadena pesada en su genoma. El animal puede tener una alteración elegida como diana en un gen que codifica una cadena ligera en su genoma.

Los animales desvelados en el presente documento son útiles como modelos animales de investigación para enfermedad infecciosa e investigación de inmunología. Los animales inmunodeficientes descritos en el presente documento que carecen de producción de inmunoglobulinas nativas y, normalmente, carecen de producción de linfocitos B, pueden usarse en investigación científica para estudiar, por ejemplo, mecanismos de inmunidad protectora o para investigar y probar tratamientos contra trastornos en un contexto veterinario. En ciertas realizaciones, los animales descritos en el presente documento pueden usarse para estudiar si una infección viral tal como el síndrome respiratorio y reproductivo porcino (SRRP) requiere linfocitos B para virulencia. Además, estos animales pueden usarse para estudiar enfermedades encontradas en seres humanos. En ciertas realizaciones, los animales se usan para desarrollar terapias para enfermedades humanas en vez de modelos de roedor más comúnmente usados. Animales grandes, tales como ungulados, y lo más particularmente cerdos, son fisiológicamente más similares a los seres humanos que los roedores, y así proporcionan un modelo más eficaz para estudiar los mecanismos de enfermedad y para el desarrollo y estudio de posibles terapéuticos humanos. Por tanto, en una realización, se proporciona un método de probar mecanismos de enfermedad que comprende exponer un animal que carece de inmunoglobulinas nativas y carece de producción de linfocito B, en el que el porcino tiene una alteración elegida como diana en ambos alelos de la región de unión J δ de la cadena pesada porcina, a un agente que produce una enfermedad y analizar una respuesta en el animal. La respuesta puede ser una respuesta celular o puede ser una respuesta fisiológica macroscópica, tal como la esperanza de vida.

En otras realizaciones de la divulgación, los animales no expresan inmunoglobulinas nativas, pero expresan al menos una inmunoglobulina de una especie diferente. En realizaciones particulares, los animales expresan al menos una inmunoglobulina humana. En algunas realizaciones, los animales son útiles para la producción de biológicos xenógenos, y en realizaciones particulares son útiles para la producción de anticuerpos xenógenos.

En algunas realizaciones, los animales son útiles para la producción de inmunoglobulina intravenosa terapéutica (IGIV) para su uso en el tratamiento de trastornos humanos. En el presente documento también se desvelan hemoderivados derivados de animales descritos en el presente documento, y en particular, en el presente documento se desvela IGIV derivada de un animal descrito en el presente documento. Se desvela una IGIV específica para un antígeno particular o selección de antígenos. Una IGIV tal se desvela en una dosis al menos suficiente para proporcionar inmunidad pasiva durante una semana, o durante al menos dos semanas, o durante al menos tres semanas, o durante al menos cuatro semanas. La IGIV puede ser una IGIV completamente humana.

Se describen animales y métodos de su producción y uso que carecen de producción de inmunoglobulina nativa y son adicionalmente deficientes en al menos un gen adicional nativo para el animal. Los animales también pueden ser deficientes en una enzima glicosiltransferasa. La enzima puede ser $\alpha(1,3)$ galactosiltransferasa.

Los animales que carecen de producción de inmunoglobulinas endógenas pueden adicionalmente expresar al menos una proteína recombinante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 ilustra la arquitectura del locus Hc porcino. La Figura 1(a) es un esquema del locus Hc porcino. La Figura 1(b) muestra la región que va a elegirse como diana que está ampliada, y el vector que elige diana se muestra debajo de ella. La Figura 1(c) muestra el locus Hc porcino elegido como diana, con la única región JH funcional delecionada.

La Figura 2 muestra la estrategia de cribado por transferencia Southern para camadas y transferencia representativa.

La Figura 2(a) muestra dos transferencias Southern diferentes digeridas con tanto la enzima XbaI como NcoI y posteriormente sondadas. Los tamaños de banda correspondientes para un alelo no mutante (WT) o elegido como diana (K.O.) se muestran arriba y abajo, respectivamente. La Figura 2(b) muestra una imagen de un análisis de transferencia Southern de ADN digerido con XbaI, un alelo no elegido como diana muestra una

banda a 22 kb, como se describe en la Fig. 2a. Un alelo elegido como diana muestra una banda a 3,3 kb. Los números de carril se corresponden con los números de lechones y sus genotipos mostrados en la Tabla 1.

La Figura 3 muestra un análisis de citometría de flujo de muestras de sangre de cerdo que carecen de glóbulos rojos teñidas con tanto Ab anti-Hc porcino (clon M160) como control de isotipo IgG1 de ratón y se analizaron por citometría de flujo. Se tiñeron WBC de cerdo con Ab de ratón anti-Hc porcino (clon M160) o control de isotipo IgG1 de ratón. Las células se lavaron y se tiñeron con cabra anti-IgG1 de ratón marcado fluorescentemente. Se muestra un histograma representativo de un cerdo compañero de camada WT (lechón número 6, fila superior), que tuvo 30,8 % de células IgM+ (PE-A) en la población de linfocitos seleccionada determinada en el diagrama de dispersión. Un cerdo Hc KO (Hc +/-) heterocigótico representativo (lechón número 1, fila central) tuvo menos porcentaje de IgM+ en la misma puerta (25,9 %). También se muestra un cerdo Hc -/- representativo (lechón número 9, fila inferior), que tuvo expresión de IgM casi nula (justo como el control de isotipo).

La Figura 4 es un análisis de transcripción de diferentes isotipos de Ig en el bazo. La Figura 4(a) es una imagen que muestra la recuperación por RT-PCR de transcritos esplénicos que codifican IgA (A); IgG (G) y IgM (M) en los lechones 1-9 de diversos genotipos. Se indica el genotipo Hc, que se corresponde con los lechones 1-9 como se enumera en la Tabla 1. Se indican controles negativos para la PCR de primera ronda (bk 1+2) y la segunda ronda (bk 2) junto con una escala de longitud de polinucleótidos (L). La Figura 4(b) es una imagen que muestra la recuperación por RT-PCR de transcritos para IgM en los WBC de lechones elegidos. (c) Recuperación por RT-PCR de transcritos TCR β de lechones elegidos.

La Figura 5 muestra tinción de inmunofluorescencia representativa de ganglios linfáticos mesentéricos (LN) de lechones WT, Hc +/- y Hc -/- dentro de una camada. Se extirparon los LN mesentéricos y se tiñeron con anticadena ligera kappa porcina, anti-cadena ligera lambda porcina, anti-IgM porcina, o un control de isotipo. En el lechón WT (fila superior), la tinción para cualquier cadena ligera y para IgM es positiva en folículos de LN. En lechones Hc +/- (fila central), puede encontrarse un patrón de tinción similar. En lechones Hc -/- (fila inferior), no hay tinción para ninguna cadena ligera o IgM. Aumentos 200x. Todos los Ab primarios fueron isotipo IgG1 de ratón.

La Figura 6 muestra tinciones con H y E representativas de LN mesentéricos de lechones WT, Hc +/- y Hc -/- dentro de una camada. Se extrajeron LN mesentéricos y se tiñeron con H y E, y se analizaron las áreas de desarrollo folicular. En lechones WT (fila superior), los folículos se desarrollaron y tienen un centro germinal distinto. Esto es más visible al mayor aumento (alto, 200x, lado derecho), que se muestra en el menor aumento (bajo, 100x, lado izquierdo) en el recuadro negro. En lechones Hc +/- (fila central), los folículos tienen estructura, pero no están completamente desarrollados, y carecen de un centro germinal intacto. En lechones Hc -/- (fila inferior), no hay desarrollo de centros foliculares o germinales distinguible.

La Figura 7 muestra inmunohistoquímica (IHC) representativa de LN de lechones WT, Hc +/- y Hc -/- dentro de una camada. Se extrajeron LN mesentéricos y se tiñeron con anti-CD3 humano o anti-CD79 α humano, respectivamente, que reaccionan de forma cruzada con CD3 y CD79 α porcino sobre linfocitos T y B, respectivamente. En el lechón WT (fila superior), los linfocitos T rodean los folículos. Los linfocitos B se encuentran en los folículos, que rodean células dendríticas foliculares en los centros germinales. En lechones Hc +/- (fila central), se encuentra un patrón de expresión similar. En lechones Hc -/- (fila inferior), no hay linfocitos B. Los números de linfocitos T parecen normales, pero carecen de la estructura del desarrollo de centros foliculares y germinales como se muestra en LN WT y Hc +/- . Aumento 100x.

La Figura 8 muestra tinción de inmunofluorescencia de linfocitos IgM+ aislados de un lechón WT (Hc +/+) y tres Hc -/-. Los lechones se muestrearon a las 8 semanas de edad, después de que se hubieran destetado (destete a las 4 semanas de edad). Los lechones Hc -/- no tuvieron linfocitos IgM+ detectables.

La Figura 9 es un diagrama del vector de expresión pCTLA4-Ig usado para producir cerdos transgénicos pCTLA4-Ig. La región extracelular de pCTLA4, fusionada con las regiones CH2/CH3 de IgG1 humana, se insertó en un casete de expresión que contenía un potenciador del CMV / promotor de β -actina de pollo / intrón de globina de conejo, además de secuencias de aislador flanqueantes.

Las Figuras 10a y b son análisis de transferencia Western de lisados de cola de cerdos transgénicos pCTLA4-Ig (10a) y órganos de cerdos transgénicos pCTLA4-Ig de un animal transgénico representativo (10b) bajo condiciones reducidas y desnaturizantes. Las bandas se detectaron con anticuerpo anti-IgG1 humana.

La Figura 11 muestra tinción inmunofluorescente para IgG1 humana en secciones de órganos de tejidos de un cerdo transgénico para pCTLA4-Ig. Todos los tejidos mostraron tinción uniforme intensa, que indica que todos los tipos de tejido expresaron y secretaron pCTLA4-Ig.

Las Figuras 12a y b son análisis de ELISA de niveles de IgG en suero (mg/ml) (12a) y niveles de IgM en suero (mg/ml) (12b) en cerdos pCTLA4-Ig. Los cerdos 244-1 y 244-6 son compañeros de camada no transgénicos.

La Figura 13 es un análisis de ELISA de niveles de pCTLA4-Ig en suero (μ g/ml) en cerdos pCTLA4-Ig.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se desvelan animales, y en particular animales porcinos, que tienen una delección dirigida a genes homocigóticos que elimina la producción de anticuerpos endógenos funcionales. El animal puede incluir una delección dirigida a genes de la única región J funcional del gen de Ig de la cadena pesada (Hc) porcino.

Sorprendentemente, se encontró que animales que tienen un fenotipo Hc nulo (-/-) carecen de expresión de inmunoglobulina endógena (tanto superficie celular como secretada) y carecen de linfocitos B. Los animales

desvelados en el presente documento son útiles como modelos de animales grandes inmunodeprimidos, ya que carecen de reordenamiento de inmunoglobulina productivo y posterior expresión de Ig. Normalmente, estos animales carecen de linfocitos B, y, por tanto, carecen de respuestas humorales. Actualmente, no hay modelos de animales grandes que carezcan de una respuesta humoral. Esto es un gran avance en comparación con los modelos de roedor, ya que los modelos inmunológicos de roedor frecuentemente no se traducen a mamíferos más grandes, tales como cerdos y seres humanos.

Hasta el punto que un gen es "alterado" para fines de la presente invención, el gen puede ser alterado por delección de toda o una porción de un intrón o exón, o ambos, por mutación de uno o más nucleótidos dentro del gen, por interrupción o inserción de una o más secuencias exógenas dentro del gen o por inactivación del gen, tal como por mutación, delección, inserción o interrupción de un promotor o secuencia potenciadora dentro del genoma.

Animales de la divulgación

Los animales desvelados en el presente documento son útiles como modelos animales de investigación para enfermedad infecciosa e investigación de inmunología. Normalmente, los animales, y particularmente los animales porcinos descritos en el presente documento, carecen de producción de inmunoglobulinas. Los animales pueden estar inmunodeprimidos por carecer de linfocitos B.

Los animales desvelados en el presente documento normalmente son ungulados. Los ungulados son animales con pezuñas e incluyen caballo, cebra, burro, ganado vacuno/bisonte, rinoceronte, camello, hipopótamo, cabra, búfalo de agua, cerdo, oveja, jirafa, okapi, alce americano, ciervo, tapir, antilope y gacela. En realizaciones particulares de la divulgación, el animal es un cerdo. Debido a su similitud anatómica y fisiológica a los seres humanos, el cerdo se ha convertido en un importante animal de investigación (Book y Bustad 1974, Almond, 1996). Los cerdos comparten una mayor homología de secuencias con el ser humano para la mayoría de los genes de Ig que los ratones. Además, son omnívoros como los seres humanos, tienen una flora intestinal similar y se infectan por patógenos virales y bacterianos estrechamente relacionados. Por estos motivos, se usan frecuentemente para modelar enfermedades intestinales humanas.

El animal, y en particular el animal porcino, puede carecer de o tener solo un locus de gen de la cadena pesada porcino alterado. El animal puede carecer de un gen que codifica una región de unión de la cadena pesada en su genoma. El animal puede no producir ninguna proteína de la cadena pesada. El animal, y en particular el animal porcino, puede carecer de o tener un locus de gen de la cadena ligera porcino alterado. El animal puede no producir ninguna proteína de la cadena ligera.

Las moléculas de anticuerpo se ensamblan a partir de combinaciones de elementos génicos variables, y las posibilidades resultantes de combinar los muchos elementos génicos variables en la línea germinal permiten que el huésped sintetice anticuerpos para un número extraordinariamente grande de antígenos. Cada molécula de anticuerpo consiste en dos clases de cadenas de polipéptidos: cadenas ligeras (cadenas L), que pueden ser tanto cadenas L kappa (κ) como lambda (λ); y cadenas pesadas (cadenas H). Las cadenas H y L se unen juntas para definir una región de unión para un epítipo sobre el antígeno.

En la naturaleza, una única molécula de anticuerpo tiene dos copias idénticas de la cadena L y dos de la cadena H. Cada una de las cadenas incluye una región variable (V) y una región constante (C). La región variable es el sitio de unión al antígeno de la molécula y, por tanto, es específica para un epítipo particular. Para lograr el variado reconocimiento de antígenos, el ADN que codifica la región variable se somete a reordenamiento de genes. La secuencia de aminoácidos de la región constante, por otra parte, es específica para un isotipo particular del anticuerpo y para el huésped que produce el anticuerpo, y así no se somete a reordenamiento.

La secuencia de ADN que codifica una región V completa se genera por la recombinación somática de segmentos génicos separados. El dominio V de una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina está codificado por más de un segmento génico. Para la cadena ligera, el dominio V está codificado por dos segmentos de ADN separados. El primer segmento codifica los primeros 95-101 aminoácidos de la cadena ligera y se llama un segmento génico V debido a que codifica la mayoría del dominio V. El segundo segmento codifica el resto del dominio V (hasta 13 aminoácidos) y se llama un segmento de unión o génico J. La unión de un segmento génico V y J crea un exón continuo que codifica toda la región V de la cadena ligera. Para preparar un ARN mensajero de cadena ligera completa de inmunoglobulina, el exón de la región V se une a la secuencia de la región C por corte y empalme de ARN después de la transcripción.

Una región V de la cadena pesada está codificada en tres segmentos génicos. Además de los segmentos génicos V y J (indicados VH y JH para distinguirlos de VL y JL de la cadena ligera), hay un tercer segmento génico llamado el segmento génico de diversidad o DH, que se encuentra entre los segmentos génicos VH y JH. El proceso de recombinación que genera una región V de la cadena pesada completa se produce en dos etapas separadas. En la primera, un segmento génico DH se une a un segmento génico JH; entonces un segmento génico VH se reordena a DJH para hacer un exón de la región VH completo. Al igual que con los genes de la cadena ligera, el corte y empalme de ADN une la secuencia de la región V ensamblada al gen de la región C vecino.

La diversificación del repertorio de anticuerpos se produce en dos etapas: principalmente por reordenamiento ("recombinación V(D)J") de los segmentos génicos V, D y J de Ig en linfocitos B precursores residentes en la médula ósea, y luego por recombinación por mutación somática y por conmutación de clase de estos genes de Ig reorganizados cuando los linfocitos B maduros se activan. La mutación somática de inmunoglobulina y la conmutación de clase son fundamentales para la maduración de la respuesta inmunitaria y la generación de una respuesta de "memoria".

El mecanismo de reordenamiento de ADN para dominios variables para lograr el reconocimiento del antígeno es similar para la región variable de tanto los loci genómicos de la cadena H como L, aunque solo se necesita un evento de unión para generar un gen de la cadena L, mientras que se necesitan dos para generar un gen de la cadena H completo. El mecanismo de reordenamiento más común implica la salida del bucle y delección del ADN entre dos segmentos génicos. Esto se produce cuando las secuencias codificantes de los dos segmentos génicos están en la misma orientación en el ADN. Puede producirse un segundo modo de recombinación entre dos segmentos génicos que tienen orientaciones transcripcionales opuestas. Este modo de recombinación es menos común, aunque para los segmentos génicos V-κ y J-κ, hasta la mitad de los cuales en los seres humanos tienen orientaciones opuestas, tales reordenamientos pueden explicar hasta la mitad de todas las uniones.

Los loci genómicos de los anticuerpos son muy grandes y se localizan sobre diferentes cromosomas. Los segmentos génicos de inmunoglobulinas están organizados en tres agrupaciones o loci genéticos: los loci κ, λ y de la cadena pesada. Cada uno está organizado ligeramente de forma diferente. Por ejemplo, en seres humanos, los genes de inmunoglobulinas están organizados del siguiente modo. El locus de la cadena ligera λ se localiza sobre el cromosoma 22 y una agrupación de segmentos del gen Vλ va seguida de cuatro conjuntos de segmentos génicos Jλ cada uno ligado a un único gen Cλ. El locus de la cadena ligera κ está sobre el cromosoma 2 y la agrupación de los segmentos génicos Vκ va seguida de una agrupación de segmentos génicos JK, y entonces por un único gen CK. La organización del locus de la cadena pesada, sobre el cromosoma 14, se parece a la del locus κ, con agrupaciones separadas de segmentos génicos VH, D H y JH y de genes CH. El locus de la cadena pesada se diferencia en una forma importante: en lugar de una única región C, contiene una serie de regiones C desplegadas una después de la otra, correspondiéndose cada una con un isotipo diferente. Hay cinco isotipos de la cadena pesada de la inmunoglobulina: IgM, IgG, IgA, IgE e IgD. Generalmente, una célula expresa solo uno cada vez, empezando con IgM. La expresión de otros isotipos, tales como IgG, puede producirse mediante conmutación de isotipo.

La unión de los diversos genes V, D y J es un evento aleatorio que produce aproximadamente 50.000 combinaciones diferentes posibles para VDJ(H) y aproximadamente 1.000 para VJ(L). El posterior emparejamiento aleatorio de las cadenas H y L lleva el número total de especificidades de anticuerpo a aproximadamente 10^7 posibilidades. La diversidad se aumenta adicionalmente por la imprecisa unión de diferentes segmentos genéticos. Los reordenamientos se producen sobre ambas hebras de ADN, pero solo se transcribe una hebra (debido a exclusión alélica). Solo se produce un reordenamiento en la vida de un linfocito B debido a delecciones irreversibles en el ADN. Por consiguiente, cada linfocito B maduro mantiene una especificidad inmunológica y se mantiene en la progenie o clon. Esto constituye la base molecular de la selección clónica; es decir, cada determinante antigénico desencadena la respuesta del clon pre-existente de linfocitos B que lleva la molécula específica de receptor. El repertorio primario de linfocitos B, que se establece por recombinación V(D)J, se controla principalmente por dos genes estrechamente ligados, el gen activante de la recombinación (RAG)-1 y RAG-2.

Durante la última década se ha revelado una considerable diversidad entre vertebrados en tanto la diversidad de genes de Ig como el desarrollo de repertorios de anticuerpos. Los roedores y los seres humanos tienen cinco clases de la cadena pesada, IgM, IgD, IgG, IgE e IgA, y cada una tiene cuatro subclases de IgG y una o dos subclases de IgA, mientras que los conejos tienen un único gen de la cadena pesada de IgG, pero 13 genes para diferentes subclases de IgA (Brunett, R. C et al. EMBO J 8:4047; Honjo, In Honjo, T, Alt. F. W. T. H. eds, Immunoglobulin Genes, p. 123 Academic Press, New York). Los cerdos tienen al menos seis subclases de IgG (Kacskovics, I et al. 1994 J Immunol 153:3565), pero no IgD (Butler et al. 1996 Inter. Immunol 8:1897-1904). Un gen que codifica IgD solo se ha descrito en roedores y primates. La diversidad en el mecanismo del desarrollo de repertorios se ejemplifica contrastando el patrón observado en roedores y primates con el informado para pollos, conejos, cerdos y los bóvidos domesticados. Aunque el primer grupo tienen un gran número de VH, genes que pertenecen a siete a 10 familias (Rathbun, G. In Hongo, T. Alt. F. W. y Rabbitts, T. H., eds, Immunoglobulin Genes, p. 63, Academic press New York), los genes VH de cada miembro del último grupo pertenecen a una única familia de genes VH (Sun, J. et al. 1994 J. Immunol. 153:56118; Dufour, V et al, 1996, J Immunol. 156:2163). Con la excepción del conejo, esta familia está compuesta por menos de 25 genes. Mientras que los roedores y primates pueden utilizar cuatro a seis segmentos JH, solo un único JH está disponible para el desarrollo de repertorios en el pollo (Reynaud et al. 1989 Adv. Immunol. 57:353). Similarmente, Butler et al. (1996 Inter. Immunol 8:1897-1904) supusieron que los cerdos pueden parecerse al pollo porque solo tiene un único gen JH. Estas especies tienen generalmente menos genes V, D y J; en el cerdo y vaca existe una única familia de genes VH, que consiste en menos de 20 segmentos génicos (Butler et al, Advances in Swine in Biomedical Research, eds: Tumbleson y Schook, 1996; Sinclair et al, J. Immunol. 159: 3883, 1997). Junto con menores números de segmentos génicos J y D, esto produce significativamente menos diversidad que la que se genera por el reordenamiento de genes. Sin embargo, parece haber mayor número de genes de la cadena ligera en estas especies. Similar a los seres humanos y ratones, estas especies expresan una única cadena ligera K, pero múltiples genes de la cadena ligera λ. Sin embargo, no parece que éstos afecten la

diversidad limitada que se logra por el reordenamiento. Para una revisión reciente sobre Ig, el desarrollo de repertorios de anticuerpos y de linfocitos B en cerdos en comparación con otras especies, véase Butler Dev Comp Immunol. Sep 17 2008 (publicación en línea adelantada, actualmente en prensa).

5 Como la unión combinatoria de más de 100 VH, 20-30 DH y cuatro a seis segmentos génicos JH es un mecanismo importante de generación del repertorio de anticuerpos en seres humanos, especies con menos segmentos VH, DH o JH deben tanto generar un repertorio más pequeño como usar mecanismos alternativos para el desarrollo de repertorios. Los rumiantes, cerdos, conejos y pollos utilizan varios mecanismos para generar diversidad de anticuerpos. En estas especies parece haber un desarrollo de repertorios secundario importante, que se produce en
10 tejido linfóide altamente especializado tal como placas ileales de Peyer (Binns y Licence, Adv. Exp. Med. Biol. 186: 661, 1985). Se produce desarrollo de repertorios secundario en estas especies por un proceso de mutación somática que es un proceso aleatorio y no completamente entendido. El mecanismo para esta diversificación de repertorios parece ser mutación con molde, o conversión génica (Sun et al, J. Immunol. 153: 5618, 1994) e hipermutación somática.

15 La conversión génica es importante para la diversificación de anticuerpos en algunos vertebrados superiores, tales como pollos, conejos y vacas. En ratones, sin embargo, parece que los eventos de conversión son poco frecuentes entre genes de anticuerpos endógenos. La conversión génica es un mecanismo de diversificación distinto caracterizado por transferencias de secuencias homólogas de un segmento génico V de anticuerpo donante a un
20 segmento génico V de aceptor. Si los segmentos del donante y aceptor tienen numerosas diferencias de secuencia, entonces la conversión génica puede introducir un conjunto de cambios de secuencia en una región V por un único evento. Dependiendo de las especies, los eventos de conversión génica pueden producirse antes y/o después de la exposición al antígeno durante la diferenciación de linfocitos B (Tsai et al. International Immunology, Vol. 14, No. 1, 55-64, January 2002).

25 La hipermutación somática logra la diversificación de genes de anticuerpos en todas las especies de vertebrados superiores. Está tipificada por la introducción de mutaciones puntuales individuales en los segmentos V(D)J de anticuerpo. Generalmente, parece que la hipermutación se activa en linfocitos B por estimulación antigénica.

30 El animal puede carecer de o solo tener un locus del gen de la cadena pesada alterado en su genoma, pero no tener alteraciones de sus niveles de linfocitos T de un animal que no tiene un locus del gen de la cadena pesada alterado. El animal puede adicionalmente ser deficiente en la producción de linfocitos T. El animal puede tener linfocitos T reducidos o carecer de producción de linfocitos T mediante una mutación en su genoma, tal como mediante una alteración o delección de un gen RAG-1 o RAG-2. Se describen cerdos deficientes en RAG-1 en las publicaciones de
35 patente N° US 2005-0155094 y WO 03/066855. Pueden encontrarse secuencias de ADNc del gen Rag-2 porcino en los números de acceso de GenBank NM001128481 y AB091391. Pueden prepararse animales defectuosos en linfocitos T, particularmente cerdos, por alteración del gen FOXN1 (también conocido como whn). El animal puede carecer de linfocitos T mediante intervención farmacológica o quirúrgica. Un animal tal puede carecer de o ser deficiente en tanto linfocitos B como T.

40 Un animal deficiente en linfocitos B es útil en investigación científica, por ejemplo, para estudiar mecanismos de inmunidad protectora o para investigar y probar tratamientos contra trastornos en un contexto veterinario. Por ejemplo, pueden usarse animales deficientes en linfocitos B para estudiar si una infección viral tal como el síndrome respiratorio y reproductivo porcino (SRRP) requiere linfocitos B para virulencia. Además, estos animales pueden
45 usarse para estudiar enfermedades encontradas en seres humanos y para desarrollar terapias en vez de los modelos de roedor más comúnmente usados. Animales grandes, tales como ungulados, y lo más particularmente cerdos, son fisiológicamente más similares a los seres humanos que los roedores, y así proporcionan un modelo más eficaz para estudiar los mecanismos de enfermedad y para el desarrollo y estudio de posibles terapéuticos humanos. Por ejemplo, estos animales del modelo pueden usarse para estudiar enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, síndrome respiratorio y reproductivo porcino (SRRP), gripe, VIH, CMV, hepatitis, malaria, el efecto de
50 toxinas y bacterias resistentes a antibióticos. Por tanto, en una realización, se proporciona un método de probar mecanismos de enfermedad que comprenden exponer un animal porcino deficiente en producción de linfocitos B, que está genéticamente modificado y carece de expresión de la inmunoglobulina de la cadena pesada porcina funcional, en el que el porcino tiene una alteración elegida como diana en ambos alelos de la región de unión J δ de la cadena pesada porcina, a un agente que produce una enfermedad y analizar una respuesta en el animal. La respuesta puede ser una respuesta celular o puede ser una respuesta fisiológica macroscópica, tal como la esperanza de vida.

55 En ciertas realizaciones alternativas de la divulgación, los animales son al menos parcialmente deficientes en linfocitos B. Los animales pueden tener menos del 50 % de los niveles normales de inmunoglobulinas. Los animales pueden tener menos del 30 %, menos del 20 % o menos del 10 % del nivel de inmunoglobulinas en plasma de un cerdo no mutante. El nivel de linfocitos B cuando se compara con un cerdo no mutante puede reducirse el 80 %, o el 90 %, o el 95 % o el 98 % o el 99 % o el 100 %.

65 En otras realizaciones de la divulgación, los animales expresan al menos una inmunoglobulina de una especie diferente, pero no expresan inmunoglobulina nativa al animal. Los animales pueden expresar al menos una

inmunoglobulina humana. Los animales pueden expresar al menos una inmunoglobulina xenógena, pero no expresan una inmunoglobulina para el animal. Los animales pueden expresar al menos una inmunoglobulina humana.

En otras realizaciones de la divulgación, los animales pueden estar adicionalmente genéticamente modificados para expresar loci de inmunoglobulina xenógena. Como alternativa, se desvelan animales porcinos que contienen un locus de inmunoglobulina xenógena. Los loci de inmunoglobulina xenógena pueden ser una inmunoglobulina de la cadena pesada y/o ligera o fragmento de la misma. Los loci de inmunoglobulina xenógena pueden ser un locus de la cadena kappa o fragmento del mismo y/o un locus de la cadena lambda o fragmento del mismo. Un cromosoma artificial (AC) puede contener la inmunoglobulina xenógena. El AC puede ser un AC de levadura o un AC de mamífero. El locus xenógeno puede ser un locus de inmunoglobulina humana o fragmento del mismo. El locus de inmunoglobulina humana puede ser el cromosoma 14 humano, el cromosoma 2 humano y el cromosoma 22 humano, o fragmentos de los mismos. El locus de inmunoglobulina humana puede incluir cualquier fragmento de una inmunoglobulina humana que pueda someterse a reordenamiento. Los loci de inmunoglobulina humana pueden incluir cualquier fragmento de una cadena pesada de inmunoglobulina humana y una cadena ligera de inmunoglobulina humana que pueda someterse a reordenamiento. Los loci de inmunoglobulina humana pueden incluir cualquier locus de inmunoglobulina humana o fragmento del mismo que pueda producir un anticuerpo tras la exposición a un antígeno. La inmunoglobulina humana exógena puede expresarse en linfocitos B para producir inmunoglobulina xenógena en respuesta a la exposición a uno o más antígenos.

En el presente documento también se desvelan ungulados y células de ungulados que carecen de al menos un alelo de una región funcional de un locus de la cadena pesada del ungulado, de la cadena ligera kappa y/o de la cadena ligera lambda producido según los procesos, secuencias y/o construcciones descritas en el presente documento, que se modifican adicionalmente para expresar al menos parte de un locus de anticuerpo humano (es decir, inmunoglobulina (Ig)). Se desvelan animales porcinos que expresan inmunoglobulina xenógena. Este locus humano puede someterse a reordenamiento y expresar una diversa población de moléculas de anticuerpo humano en el ungulado. Estos ungulados transgénicos clonados proporcionan un suministro reponible de anticuerpos humanos (tales como anticuerpos policlonales), que pueden usarse para fines terapéuticos, de diagnóstico, purificación y otros fines clínicamente relevantes. Pueden usarse cromosomas artificiales (AC), tales como cromosomas artificiales de levadura o de mamífero (YACS o MACS), para permitir la expresión de genes de inmunoglobulina humana en células de ungulados y animales. Todos o parte de los genes de la inmunoglobulina humana, tales como el gen de la cadena pesada de Ig (cromosoma 414 humano), el gen de la cadena kappa de Ig (cromosoma 2 humano) y/o el gen de la cadena lambda de Ig (cromosoma 22) pueden insertarse en los cromosomas artificiales, que pueden entonces insertarse en células de ungulado. Se desvelan ungulados y células de ungulado que contienen tanto parte como todo de al menos un locus de gen de anticuerpo humano, que se somete a reordenamiento y expresa una diversa población de moléculas de anticuerpo humano.

Se describen animales y métodos de su producción y uso que no producen anticuerpos nativos para las especies de animales y son adicionalmente deficientes en al menos un gen endógeno o producto génico adicional. Los animales también pueden ser deficientes en una enzima glicosiltransferasa. La enzima puede ser $\alpha(1,3)$ galactosiltransferasa. Pueden modificarse animales o células que carecen de la expresión de inmunoglobulina funcional para eliminar la expresión de al menos un alelo del gen de alfa-1,3-galactosiltransferasa, el gen de CMP-Neu5Ac hidroxilasa (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 7.368.284), el gen de iGb3 sintasa (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. N° 2005-0155095) y/o el gen de sintasa de Forssman (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. N° 2006-0068479). Debido a que los seres humanos y los primates del viejo mundo carecen de esta enzima (como serían cerdos deficientes en $\alpha(1,3)$ galactosiltransferasa), los anticuerpos derivados de animales que carecen de una enzima $\alpha(1,3)$ galactosiltransferasa funcional podrían tener un tiempo de eliminación reducido o semivida del anticuerpo elevada. Esto sería una mejora con respecto a otros anticuerpos derivados de ungulados.

Los animales que carecen de producción de anticuerpos nativos para las especies de animales pueden adicionalmente expresar al menos una proteína recombinante. Los animales desvelados en el presente documento también pueden contener modificaciones genéticas para expresar fucosiltransferasa y/o sialiltransferasa.

Métodos de uso

Se han usado desde hace tiempo ratones deficientes en linfocitos B en investigación, y se han generado múltiples líneas (Kitamura, D., Roes, J., Kuhn, R., & Rajewsky, K. (1991) *Nature* 350, 423-426; Jakobovits, A. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 2551-2555). En estudios paralelos con ratones no mutantes y modelos de ratones deficientes en linfocitos T y B, las respuestas de linfocitos T (celulares) pueden estudiarse por separado a partir de las respuestas de linfocitos B (humorales) para muchas enfermedades. Por ejemplo, se han estudiado las respuestas inmunitarias por ratones deficientes en linfocitos B para las enfermedades bacterianas *Salmonella* (Ugrinovic, S., Menager, N., Goh, N., & Mastroeni, P. (2003) *Infect. Immun.* 71, 6808-6819), *Bordetella* (Leef, M., Elkins, K. L., Barbic, J., & Shahin, R. D. (2000) *J. Exp. Med.* 191, 1841-1852) y *tularemia* (Chen, W., KuoLee, R., Shen, H., & Conlan, J. W. (2004) *Microb. Pathog.* 36, 311-318), las enfermedades virales viruela (Wyatt, L. S., Earl, P. L., Eller, L. A., & Moss, B. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 4590-4595) y *rotavirus* (Franco, M. A. & Greenberg, H. B. (1995) *J. Virol.* 69, 7800-7806), las enfermedades parasíticas *Leishmania* (Ronet, C. et al. (2008) *J.*

Immunol. 180, 4825-4835) y malaria (Weidanz, W. P. et al. (2005) Exp. Parasitol. 111, 97-104), enfermedades inflamatorias tales como enfermedad inflamatoria del intestino (Ma, A. et al. (1995) J. Exp. Med. 182, 1567-1572) y enfermedades autoinmunitarias tales como lupus (Chan, O. T., Madaio, M. P., & Shlomchik, M. J. (1999) Immunol. Rev. 169, 107-121). Además de estudiar la respuesta inmunitaria básica a una exposición a patógeno, estos animales también se han usado para probar vacunas para eficacia (Wyatt, 2004, McNeal, M. M. et al. (2002) J. Virol. 76, 560-568). Desafortunadamente, los resultados de modelos inmunológicos de roedor frecuentemente no se traducen en mamíferos más grandes, tales como ganado y seres humanos (Forsberg, E. J. (2005) Reprod. Fertil. Dev. 17, 59-68, Melo, E. O., Canavessi, A. M., Franco, M. M., & Rumpf, R. (2007) J. Appl. Genet. 48, 47-61, Butler, J. E. & Sinkora, M. (2007) Immunol. Res. 39, 33-51, Rogers, C. S. et al. (2008) J. Clin. Invest 118, 1571-1577, Butler, J. E. et al. (2009) Vet. Immunol. Immunopathol. 128, 147-170).

Los cerdos son modelos mucho mejores que los ratones para muchas aplicaciones de investigación. Son monogástricos, con fisiología gástrica y requisitos dietéticos similares a los de los seres humanos. Su inmunidad de la mucosa también es similar a la de los seres humanos. Son de tamaño suficiente para garantizar un amplio muestreo de tejidos y sangre para análisis. Pueden producirse en entornos libres de gérmenes sin calostro, careciendo, por tanto, de cualquier efecto de confusión de la inmunidad materna pasiva. Debido que nacen en camadas, hay animales suficientes para proporcionar controles de la misma edad en los grupos en estudio.

A diferencia de los modelos de ratón, no hay en el útero transferencia de Ab materno en los cerdos, pero debido a algunas síntesis *de novo*, los lechones no nacen totalmente agammaglobulinémicos (Butler, J. E. et al. (2001) J. Immunol. 167, 3239-3249). Como hay modelos fetales en estas especies para estudios veterinarios virales e inmunológicos (véase la revisión de Butler, et al., 2009), sería beneficioso si los lechones fetales deficientes en linfocitos B estuvieran disponibles para estudios similares. También a diferencia de los ratones, los lechones son precociales, permitiéndoles ser criados separados de sus madres en instalaciones libres de gérmenes o de aisladores gnotobióticos (Butler, J. E. & Sinkora, M. (2007) Gordon y Pesti, 1971). El lechón de aislador es un modelo *in vivo* para el sistema inmunitario fetal, ya que los lechones que se mantienen bajo tales condiciones siguen siendo, inmunológicamente, animales fetales similares (Butler, J. E. et al. (2000) Immunology 100, 119-130, Butler, J. E. et al. (2005) Immunol. 175, 6772-6785, Sinkora, M. & Butler, J. E. (2009) Dev. Comp Immunol. 33, 273-283). Hasta ahora, este modelo ha demostrado ser valioso en: i) entendimiento de la inmunopatología producida por el SRRPV pandémico en el que la patología está relacionada con la activación de linfocitos B policlonales (Lemke, C. D. et al. (2004) J. Immunol. 172, 1916-1925, Butler, J. E., Wertz, N., Weber, P., & Lager, K. M. (2008) J. Immunol. 180, 2347-2356), ii) investigación de la gripe porcina (Vincent, A. L. et al. (2006) Vet. Microbiol. 118, 212-222), iii) estudiar la patología de colibacilosis (Erume, J. et al. (2008) Infect. Immun. 76, 3141-3149), y iv) entendimiento de la absorción intestinal de Ig maternas (Butler et al., 2009). Criando lechones deficientes en linfocitos B gnotobióticamente, las funciones relativas de linfocitos B y la producción de Ab, frente a linfocitos T, en el control de enfermedad viral y bacteriana postnatal, podría entenderse mejor para aplicaciones veterinarias y agrícolas.

Similitudes anatómicas, nutricionales, fisiológicas e inmunológicas a seres humanos han hecho del cerdo un animal de investigación biomédica importante (Butler et al., 2009, Rogers, C. S. et al. (2008) Science 321, 1837-1841). Por ejemplo, los cerdos son omnívoros como los seres humanos, tienen una flora intestinal similar y se infectan por patógenos virales y bacterianos estrechamente relacionados. Para la mayoría de los principales enteropatógenos, tales como *Helicobacter pylori*, *Shigella flexneri* y *Salmonella enterica*, los modelos animales de ratón no reproducen el tropismo, inmunopatología, u otros distintivos de las infecciones humanas correspondientes (Goodwin, C. S., Armstrong, J. A., & Marshall, B. J. (1986) J. Clin. Pathol. 39, 353-365, Lecuit, M. & Cossart, P. (2002) Trends Mol. Med. 8, 537-542, Lecuit, M. (2007) Microbes. Infect. 9, 1216-1225). La similitud dietética y de la mucosa de los seres humanos y cerdos ha producido su uso específico como modelos para enfermedades digestivas, respiratorias y/o infecciosas, y alergias (Charley, B., Riffault, S., & Van, R. K. (2006) Ann. N. Y. Acad. Sci. 1081, 130-136, Saif, L. J. et al. (1996) Arch. Virol. Suppl 12, 153-161, Souza, M. et al. (2007) J. Virol. 81, 9183-9192, Krakowka, S., Eaton, K. A., Rings, D. M., & Morgan, D. R. (1991) Rev. Infect. Dis. 13 Suppl 8, S681-S685, Yuan, L. et al. (1996) J. Virol. 70, 3075-3083, Cheetham, S. et al. (2006) J. Virol. 80, 10372-10381, Dawson, H. et al. (2009) Infect. Immun. 77, 2576-2587, Helm, R. M. et al. (2002) J. Allergy Clin. Immunol. 109, 136-142). Un ejemplo importante y recientemente descrito de un modelo porcino que recapituló más completamente una afección humana es el modelo de lechón inactivado para fibrosis quística (Rogers, C. S. et al. (2008) Science 321, 1837-1841).

Se infectan cerdos por patógenos virales y bacterianos estrechamente relacionados frecuentemente hasta el punto de que puedan servir de reservorios zoonóticos para patógenos humanos, y así desempeñar una función crítica en las amenazas para la salud pública en el mundo (Taylor, L. H., Latham, S. M., & Woolhouse, M. E. (2001) Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci. 356, 983-989). El virus de la gripe A H1N1 (gripe porcina) es un ejemplo zoonótico actual, relevante e importante (Neumann, G., Noda, T., & Kawakoka, Y. (2009) Nature 459, 931-939). Muchos agentes zoonóticos también tienen posibles aplicaciones en terrorismo biológico (Mattix, M. E. et al. (2006) Clin. Lab Med. 26, 445-89). Así, la disponibilidad de lechones deficientes en Ab y linfocitos B debe servir de modelos valiosos para ciertas enfermedades humanas y ayudaría en el desarrollo de vacunas vitales ayudando a atribuir inmunidad protectora a linfocitos T o B, o ambos.

Antes de la presente invención, no se habían producido cerdos genéticamente modificados con un fenotipo deficiente inmunitario. Por tanto, siguió existiendo la necesidad de un modelo de animal grande deficiente en

linfocitos B verdadero que careciera de una respuesta inmunitaria humoral y que pudiera eficazmente modelar patologías de enfermedades infecciosas humanas.

Idealmente, para entender la patología de la infección humana, se requiere un modelo animal en el que el agente infeccioso tenga, en la medida de lo posible, el mismo tropismo de células y de tejidos que en seres humanos. Además, el modelo debe permitir la observación de los mismos efectos directos y daño inmunopatológico indirecto que se produce en seres humanos (Lecuit, 2007). Para la mayoría de los principales enteropatógenos humanos, tales como *Helicobacter pylori*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, no están disponibles modelos animales de ratón que reproduzcan todos los distintivos de las infecciones humanas correspondientes (Lecuit y Cossart, 2002). Mizgerd y Skerit (2008) detallaron múltiples cuestiones en usar el ratón debido a sus diferencias del ser humano. Un agente infeccioso, tal como un virus o bacteria, o un antígeno de cualquier tipo, puede administrarse a un cerdo como se describe en el presente documento y la respuesta inmunitaria de ese cerdo al agente infeccioso puede compararse con un cerdo no mutante o un cerdo agotado en linfocitos T. Métodos incluyen la infusión de agente infeccioso mediante una variedad de vías, que incluyen intranasal, inhalación, intravenosa, parenteral, transdérmica, intravaginal, y similares, durante una variedad de periodos de tiempo. El agente infeccioso puede administrarse en combinación o alternancia con otros agentes que incluyen fármacos o anticuerpos o reactivos de agotamiento celular. Para analizar la respuesta inmunitaria del cerdo, métodos incluyen histología e histopatología durante la evolución de la progresión de la enfermedad, citometría de flujo para poblaciones de células relevantes en tejidos relevantes (por ejemplo, ganglio linfático y bazo), métodos biológicos moleculares para estudios de expresión génica tales como expresión de citocinas y quimiocinas, y otros mediadores inmunológicos tales como coagulantes y proteínas del complemento, e inmunoensayos tales como ensayos de MLR, citotoxicidad, proliferación o apoptosis para medir cuantitativamente efectos sobre el sistema inmunitario en el huésped. Para probar la utilidad de un producto, tal como un agente antiviral o antibacteriano contra un patógeno, el producto puede administrarse al animal antes, al mismo tiempo, o después de administrar el patógeno, en el que los mismos métodos analíticos se utilizan para determinar la utilidad de un producto.

Muchas enfermedades infecciosas emergentes, que incluyen aquellas con posiblemente aplicaciones en el terrorismo biológico, son zoonosis. Las zoonosis son "enfermedades que pueden transmitirse de animales salvajes y domésticos a seres humanos y son amenazas para la salud pública en el mundo" (Kahn, 2006). Taylor y otros identificaron 1415 agentes infecciosos y encontraron que 868 (61 %) podrían transmitirse entre animales y seres humanos (Taylor et al., (2001) Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 356, 983-989). Encontraron que era dos veces más probable que las enfermedades zoonóticas se asociaran a infecciones emergentes o recientemente descubiertas, en comparación con patógenos no zoonóticos, y que los virus y protozoos eran los patógenos zoonóticos que más probablemente emergerían. Se han identificado virus de ARN, en particular, como altamente probables de emerger (Cleaveland et al., (2001) Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 356, 991-999). Estos agentes incluyen virus del Nilo occidental, virus de la gripe aviaria, hantavirus y síndrome respiratorio agudo grave (SARS) – asociado a coronavirus. Los cerdos ya son un reservorio conocido para muchos de estos agentes infecciosos emergentes, que incluyen gripe y coronavirus de SARS (Charley et al., (2006) Ann N Y Acad Sci 1081, 130-136), y se han identificado como un posible reservorio huésped para la transmisión zoonótica de noravirus y sapovirus (Wang et al., (2006) J Clin Microbiol 44, 2057-2062) y hepatitis E (Meng (2003) Curr Top Microbiol Immunol 278, 185-216). Por tanto, es probable que el cerdo sea el mejor animal de modelo para estudiar enfermedades zoonóticas emergentes.

Los cerdos, a diferencia de los ratones, paren descendencia precocial y pueden, por tanto, separarse de sus madres biológicas y ponerse en aisladores libres de gérmenes. Esto permite que el investigador controle su exposición/suministro de inmunidad pasiva, bacterias comensales, antígeno dietético y exposición a patógeno (Butler y Sinkora, (2007) Immunol Res 39, 33-51). Definiciones específicas de estos tipos de animales se proporcionan y se detallan en una revisión por Gordon y Pesti, (1971) Bacteriol Rev 35, 390-429 e incluyen:

Se obtienen *Gnotobiot* (animal gnotobiótico) por cesárea aséptica (o eclosión estéril de huevos) y se crían y se mantienen continuamente con técnicas libres de gérmenes bajo condiciones de aislador y en los que la composición de cualquier fauna y flora asociada, si está presente, se define completamente por la actual metodología aceptada. Un gnotobiot mantenido bajo condiciones de aislador en asociación intencionada con uno o más tipos conocidos de microorganismos se considera de una 'flora definida'. Un gnotobiot que está libre de todas las formas asociadas demostrables de vida que incluyen bacterias, virus, hongos, protozoos y otras formas saprofíticas o parasíticas se considera 'libre de gérmenes'.

Se han usado lechones privados del calostro derivado de la cesárea (CDCD) (que no reciben ninguna inmunidad maternalmente derivada), producidos bajo condiciones libres de patógenos (específicas SPF), por ejemplo, para probar la patogenicidad de cepas aisladas virales (Halbur et al., (1996) J Vet Diagn Invest 8, 11-20) y para evaluar vacunas (Welter y Welter, (1990) Veterinary microbiology 22, 179-186). Sin embargo, tales cerdos CDCD no son gnotobiotos.

Antes de la presente invención, estos tipos de cerdos eran los únicos modelos para estudios de enfermedad infecciosa que podrían no ser bien modelados en ratones. Estos modelos tienen problemas asociados. Es extremadamente difícil, laborioso y caro mantener una instalación de cerdos gnotobióticos. La esterilidad del

huésped libre de gérmenes no puede asegurarse por criterios absolutos. Pueden seguir virus latentes sin detectar. Todo el alimento debe esterilizarse y estar libre de patógenos. Por tanto, hay una posible confusión de los resultados científicos debido a variaciones en la calidad del pienso, ya que la rigurosa esterilización con vapor puede hacer que se degraden los nutrientes en el pienso. También puede haber efectos debidos a la falta de flora intestinal en un animal que normalmente tiene flora intestinal que participa en la digestión. Los animales pueden tener una menor velocidad metabólica, experimentar diarrea, y comer o beber más debido a la ausencia de función reguladora microbiana (Gordon y Pesti, 1971).

A pesar de un modelo de investigación exigente con el que trabajar, varios grupos han hecho una amplia investigación sobre la patología de la enfermedad humana usando cerdos gnotobióticos. Se han usado cerdos gnotobióticos como modelo para la infección por rotavirus humano. Las ventajas de uso de este modelo (con respecto a ratón y conejo) se detallan por Saif et al., (1996) Arch Virol Suppl 12, 153-161e incluyen: la infección en otras especies es normalmente solo subclínica, los cerdos gnotobióticos siguen siendo susceptibles a la infección por rotavirus humano durante hasta 6 semanas de edad, los cerdos se parecen estrechamente a los seres humanos en fisiología gastrointestinal (son ambos monogástricos) y desarrollo inmunitario de la mucosa, y la confusión de los resultados de investigación por la presencia de otros patógenos puede prevenirse en el entorno gnotobiótico. Avances importantes de estos estudios incluyen: 1) la adaptación del primer rotavirus humano a cultivo celular después del pase y amplificación en lechones, 2) delineación de las funciones independientes de las dos proteínas de la cápside externa del rotavirus (VP4 y VP7) en la inducción de anticuerpos neutralizantes y protección cruzada; y 3) reconocimiento de una posible función para una proteína no estructural, además de VP4 y VP7, en la virulencia de rotavirus (Saif et al., (1996) Arch Virol Suppl 12, 153-161). En otro estudio, se identificaron células que secretan anticuerpo IgA intestinal como una correlación de inmunidad activa protectora en este modelo animal (Yuan et al., (1996) J Virol 70, 3075-3083).

El noravirus es la causa más frecuente de las enfermedades transmitidas por la comida en los Estados Unidos (Mead et al., (1999) Emerg Infect Dis 5, 607-625). Recientemente se han encontrado cepas de noravirus porcino que están genética y antigénicamente relacionadas con aquellas que infectan seres humanos que se producen en cerdos, planteando preocupaciones de que los cerdos pueden ser posibles reservorios para este virus (Wang et al., (2006) J Clin Microbiol 44, 2057-2062). Debido a la falta de un modelo animal para infección por noravirus humano (estudios previos utilizaron muestras de voluntarios humanos infectados), y las dificultades para cultivarlo en cultivos celulares, en el pasado se ha dificultado la investigación sobre la inmunidad y vacunas para este virus. Se encontró recientemente que cerdos gnotobióticos, infectados con una cepa de noravirus humano, eran capaces de infección por cepas de rotavirus humano (Cheetham et al., (2006) J Virol 80, 10372-10381), y se han usado como modelo para estudiar respuestas intestinales y sistémicas de anticuerpos y perfiles de citocinas (Souza et al., (2007) J Virol 81, 9183-9192). Los hallazgos de tales estudios deben ser útiles para los investigadores que diseñan las estrategias de vacunación para este virus en seres humanos.

Se usaron lechones gnotobióticos como modelo animal para gastritis inducida por *Helicobacter pylori* (Krakowka et al., (1991) Rev Infect Dis 13 Suppl 8, S681-685). Previamente, experimentos de exposición oral en especies convencionales de animales, que incluyen conejos, ratas, ratones, cobayas y hámsteres, fracasaron en proporcionar un modelo apropiado para la patología humana de *H. pylori* (Goodwin et al., (1986) J Clin Pathol 39, 353-365; Morgan et al., (1988) Abstracts of the annual meeting of the American Society for Microbiology, B195, 162). Se encontró que lechones gnotobióticos colonizados con una cepa bacteriana de origen humano imitaban estrechamente la infección e inflamación aguda observada en seres humanos. Se estudió la complejidad de la respuesta inmunitaria en los lechones infectados. Además, este modelo animal permitió la identificación de factores de virulencia bacteriana y la evaluación de fármacos quimioterapéuticos para esta afección.

Aunque los cerdos gnotobióticos y libres de gérmenes han sido modelos útiles en estudios inmunológicos de enfermedad humana, sigue existiendo la limitación de que, aunque estos animales no han recibido tratamiento previo inmunológico, no son inmunodeficientes, y, por tanto, no pueden utilizarse para estudiar los diversos componentes de la respuesta inmunitaria (tales como respuestas de linfocitos B y T) por separado. Modelos de animales grandes deficientes en linfocitos B son una valiosa herramienta para estudios que pretenden determinar si la protección de agentes infecciosos veterinarios o humanos está mediada por inmunidad humoral o celular, o ambas. En la investigación de enfermedades infecciosas y el desarrollo de vacunas, es importante estudiar la respuesta inmunitaria celular y humoral, tanto juntas como por separado.

El único animal grande que se ha generado con un gen de la cadena pesada de Ig "inactivado" fue la alteración del gen *mu* pesado en ganado vacuno producido por transferencia nuclear secuencial (Kuriowa et al., (2004) Nat Genet 36, 775-780). Aunque se mostró por RT-PCR que estos animales carecían de expresión de la cadena pesada *mu*, no se describió información sobre su fenotipo inmunológico; si fueron o no deficientes en linfocitos B o inmunodeficientes de cualquier forma debido a su alteración especificada del gen *mu*. Más recientemente, el mismo grupo informó de que vacas expresan dos loci HC funcionales (Kuroiwa, Y. et al. (2009) Nat. Biotechnol. 27, 173-181), a diferencia del locus funcional expresado en ratones (Kitamura, D., Roes, J., Kuhn, R., & Rajewsky, K. (1991)), cerdos (Butler et al., 2009, Butler, J. E. et al. (2009) Dev. Comp Immunol. 33, 321-333) y seres humanos (Yel, L. et al. (1996) N. Engl. J. Med. 335, 1486-1493). Mostraron que ambos loci bovinos (cuatro alelos en total) deben ser elegidos como diana para que el ganado vacuno se vuelva deficiente en Ab y en linfocitos B (Kuroiwa, Y.

et al. (2009)).

Debe observarse que en ratones homocigóticos con una alteración elegida como diana similar de un exón del gen *mu* (Kitamura et al., (1991) Nature 350, 423-426), se informa que algunos ratones producen algunos linfocitos B usando un gen constante (C) distinto de *mu* de Ig (Infectious Disease Research and the Laboratory Mouse, A Jackson Laborator y Resource Manual, disponible en línea en http://jaxmice.jax.org/manual/infectious_disease_manual.pdf, p 20.

Antes de los cerdos proporcionados por la presente divulgación, no había forma de modelar muchas patologías de enfermedad y estudiar eficazmente las respuestas inmunitarias celulares y humores *por separado* después de la exposición y/o tras el tratamiento terapéutico. Aunque están disponibles ratones deficientes en linfocitos B, los ratones no pueden modelar muchas enfermedades humanas tan eficazmente como los cerdos. Además, los modelos de ratón inmunodeficiente actualmente disponibles pueden producir algunos linfocitos B. La elevada énfasis sobre la amenaza y el estudio de enfermedad zoonótica emergente, y en desarrollar contraataques para patógenos infecciosos usados en terrorismo biológico, motivado por el público, gobiernos y agencias internacionales tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha creado una necesidad de mejorar los modelos animales para estudiar la patología de enfermedades humanas infecciosas, y para el desarrollo y prueba de vacunas. Además, el aumento en el número de seres humanos con sistemas inmunitarios parcialmente suprimidos, de cosas tales como infección por el VIH, y el envejecimiento de la población "nacida durante el baby boom", ha creado una necesidad de estudiar la capacidad de vacunas para proteger eficazmente estos grupos en alto riesgo. También se necesitan modelos de animales grandes para estudiar *in vivo* respuestas inmunitarias en campos tales como enfermedad autoinmunitaria y rechazo de trasplante. Los cerdos deficientes en linfocitos B nulos para Hc producidos y descritos en el presente documento, y métodos de su uso para la investigación de enfermedades infecciosas y de inmunología, proporcionados en el presente documento satisfarán estas necesidades.

Los modelos de cerdo deficientes en la región de unión de la cadena pesada (JH -/-) pueden tener aplicaciones especiales en la investigación veterinaria sobre agentes tales como SRRPV, y otras infecciones. SRRPV es una enfermedad de los cerdos pandémica en el mundo que produce un impacto de más de un billón de dólares al año sobre la industria del cerdo comercial. Como parece que el SRRPV produce virulencia subvirtiendo la inmunidad humoral mediante la activación policlonal del repertorio de linfocitos B pre-inmunes (Lemke, C. D. et al. (2004) J. Immunol. 172, 1916-1925, Butler, J. E et al. (2008) J. Immunol. 180, 2347-2356), el modelo de cerdo deficiente en linfocitos B probablemente será de valor significativo en la etiología de la enfermedad. Teóricamente, si se crían lechones deficientes en linfocitos B en unidades de aislador para protegerlos de infección bacteriana, podría evaluarse el grado al que la activación de linfocitos B policlonal contribuye a la desregulación inmunitaria inducida por SRRPV. Estos mismos lechones podrían servir de modelo para determinar la función relativa de la inmunidad viral mediada por células y mediada por Ab no solo para SRRPV, sino para otros virus de cerdos neonatales problemáticos tales como gripe, parvovirus y circovirus, que tendrían valiosas aplicaciones agrícolas (Butler, J. E. & Sinkora, M. (2007)). Éstos incluyen ayudar en estrategias de vacunación para cerdos (Halbur, P. G. et al. (1996) J. Vet. Diagn. Invest 8, 11-20, Welter, M. W. & Welter, C. J. (1990) Vet. Microbiol. 22, 179-186).

También hay varias enfermedades humanas que no pueden modelarse apropiadamente en roedores. Por ejemplo, los ratones inactivados por fibrosis quística (CFTR) dejan de desarrollar cualquier forma clínicamente relevante de fibrosis quística (Rogers et al., 2008). En el caso de fibrosis quística siempre hay dudas de si infecciones bacterianas como *Pseudomonas* que están frecuentemente asociadas son efectos primarios o secundarios. De hecho, todavía no está claro si alguna patología de CF o protección de CF está mediada por Ab, una duda que podría responderse en un modelo de cerdo que es tanto CFTR -/- como JH -/-. Como los cerdos se parecen a los seres humanos en la fisiología gastrointestinal, requisitos dietéticos y la inmunidad de la mucosa, también se han utilizado como modelos gnotobióticos en estudios en los que participan rotavirus (Saif, L. J. et al. (1996), Yuan, L. et al. (1996) J. Virol. 70, 3075-3083, Yuan, L. et al. (2008) Vaccine 26, 3322-3331), norovirus (Souza, M. et al. (2007) J. Virol. 81, 9183-9192, Cheetham, S. et al. (2006) J. Virol. 80, 10372-10381) y sapovirus (Wang, Q. H. et al. (2006) J. Clin. Microbiol. 44, 2057-2062), y tanto infecciones por *Helicobacter pylori* (Krakowka, S., Eaton, K. A., Rings, D. M., & Morgan, D. R. (1991) Rev. Infect. Dis. 13 Suppl 8, S681-S685) como por *Escherichia coli* (Gunzer, F., et al. (2003) Methods Mol. Med. 73, 307-327). Por tanto, las funciones de la inmunidad humoral en estas y otras infecciones, además de en posibles infecciones zoonóticas (por ejemplo, gripe porcina (Neumann, G., Noda, T., & Kawaoka, Y), hepatitis E (Meng, X. J. (2003))), pueden tratarse con los cerdos JH -/- (Butler, J. E. & Sinkora, M. (2007), Butler et al., 2009).

Pueden usarse cerdos nulos para Hc en estudios experimentales paralelos con modelos animales porcinos que son deficientes o defectuosos en linfocitos T, tales como animales con una alteración o mutación del gen nude (también conocido como whn o FOXN1), y/o en combinación con modelos animales que son tanto deficientes en linfocitos B como T, tales como animales con una alteración o mutación del gen RAG-1 o RAG-2, que se llaman animales SCID. Estos modelos animales se han descrito en el ratón y se han usado ampliamente en investigación (Pantelouris, 1968, Nehls et al., (1994) Nature 372, 103-107, Mombaerts et al., (1992) Cell 68, 869-877, Shinkai, et al., (1992) Cell 68, 855-867).

Se producen modelos de animal de cerdo tales como nude y SCID usando técnicas como se describen en el presente documento. Además, los animales pueden hacerse deficientes en linfocitos T usando métodos quirúrgicos,

mediante tratamiento con agentes inmunosupresores, o una combinación de métodos. Los métodos de agotamiento de linfocitos T (TCD) incluyen, por ejemplo, extirpación quirúrgica del timo, métodos físicos tales como aglutinación con lectina y tratamiento con anticuerpos monoclonales. Se han descrito métodos de TCD en la bibliografía, y se usan comúnmente para suprimir respuestas inmunitarias celulares en trasplante clínico humano (Hertenstein et al., (1998) *BioDrugs* 9, 105-123). Por ejemplo, el fármaco Campath® (alemtuzumab, Bayer HealthCare Pharmaceuticals Inc., Wayne, NJ) es un anticuerpo monoclonal que reconoce >95 % de linfocitos T, linfocitos B y monocitos humanos, y fija el complemento humano provocando la lisis de linfocitos (Hale et al., (1986) *Transplantation* 42, 308-311). Otro fármaco usado clínicamente es Thymoglobulin®, una gamma-inmunoglobulina obtenida de conejos inmunizados con linfocitos T (Genzyme Corp., Cambridge MA). Pueden usarse agentes con actividad biológica similar y función de agotamiento de linfocitos T en cerdos. Un cerdo nulo para Hc, posteriormente tratado para agotar sus linfocitos T, tendrá un fenotipo SCID. Como alternativa, también pueden administrarse fármacos que prevendrán la activación de linfocitos T, tales como CTLA4-Ig (comercialmente disponible como Orencia® (abatacept, Bristol-Myers Squibb Company, NY).

El uso de los cerdos nulos en Hc en estudios de comparación paralelos con otros modelos de cerdo, tales como cerdos nude y SCID, o cerdos tratados para carecer de una respuesta de linfocitos T, o que tienen una respuesta de linfocitos T deprimida (tales como cerdos transgénicos CTLA4-Ig), permiten estudiar respuestas inmunitarias celulares y humores por separado. Se han realizado ampliamente estudios que comparan ratones deficientes en linfocitos T y B (SCID y nulo en RAG-1 o RAG-2) con ratones nude deficientes en linfocitos T en protocolos de precondicionamiento, trasplante y de exposición a patógenos (Croy et al., (2001) *Comp Med* 51, 300-313). Los modelos de animal de cerdo desvelados en el presente documento son una mejora con respecto a los modelos de ratón actualmente disponibles en muchas áreas de investigación, y proporcionarán la oportunidad de estudio inmunológico avanzado en un modelo de animal grande; un modelo más apropiado para afecciones patológicas humanas.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un uso de animales porcinos que están genéticamente modificados y carecen de una inmunoglobulina de la cadena pesada porcina funcional en el que el porcino tiene una alteración elegida como diana en ambos alelos de la región de unión J δ de la cadena pesada porcina, para probar respuestas a la exposición a patógenos o tratamiento profiláctico o terapéutico que comprende exponer un animal que carece de un locus de gen de la cadena pesada, y en particular una región de unión de la cadena pesada, a un patógeno y comparar una respuesta de tal animal al patógeno con una respuesta de un animal con una alteración de un gen FOXP1 y/o RAG-1 o RAG-2 expuesto al mismo patógeno. Estos estudios pueden ser útiles como estudios paralelos para aclarar las funciones de las diversas partes de la respuesta inmunitaria (linfocitos B y T) tras la exposición a patógenos y/o tras tratamientos profilácticos.

Hasta el punto que un medicamento se proporciona profilácticamente, el medicamento se proporciona a un huésped o animal en riesgo de un síntoma o trastorno que todavía no está padeciendo o mostrando el síntoma o trastorno. El medicamento que se prueba puede incluir terapéuticos o biológicos de molécula pequeña. En el contexto de la invención, para probar el uso profiláctico de un terapéutico, el terapéutico normalmente se administra antes de la administración de un agente patógeno o el inicio de una enfermedad o trastorno por otros medios al animal que carece de expresión de inmunoglobulinas. Hasta el punto que un medicamento se administra terapéuticamente, el medicamento se administra a un huésped que padece un síntoma o trastorno. En el contexto de la invención, hasta el punto que un agente se prueba para uso terapéutico, el agente normalmente se administra simultáneamente con o posterior a la administración de un agente patógeno o el inicio de una enfermedad o trastorno por otros medios.

En ciertos casos, la invención proporciona un método que implica un modelo para probar una vacuna. En ciertas realizaciones, la vacuna puede ser una vacuna basada en ADN, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o un virus vivo, atenuado o muerto. La vacuna puede incluir una secuencia inmunoestimulante.

Métodos de producción de anticuerpos xenógenos se desvelan en el presente documento, en el que el método puede incluir: (a) administrar uno o más antígenos de interés a un animal, particularmente un ungulado y lo más particularmente un cerdo, cuyas células comprenden uno o más cromosomas artificiales y carecen de cualquier expresión de inmunoglobulina endógena funcional, comprendiendo cada cromosoma artificial uno o más loci de inmunoglobulina xenógena que se someten a reordenamiento, produciendo la producción de anticuerpos xenógenos contra el uno o más antígenos; y/o (b) recuperar los anticuerpos xenógenos del ungulado. Los loci de inmunoglobulina pueden someterse a reordenamiento en un linfocito B.

En otras realizaciones, los animales expresan al menos una inmunoglobulina de una especie diferente, pero no expresan inmunoglobulina nativa para el animal, es decir, inmunoglobulina endógena. En realizaciones particulares, los animales expresan al menos una inmunoglobulina humana. Los animales pueden ser útiles para la producción de inmunoglobulina intravenosa terapéutica (IGIV) para su uso en el tratamiento de trastornos humanos. En el presente documento también se desvelan hemoderivados derivados de animales descritos en el presente documento e IGIV derivada de un animal descrito en el presente documento. La IGIV derivada de los animales desvelados en el presente documento normalmente contiene anticuerpos reunidos no nativos para las especies de animal desveladas en el presente documento que se extraen del plasma de un animal donante. Pueden usarse IGIV como tratamiento en inmunodeficiencias primarias tales como, en un ejemplo no limitante, gammaglobulinemia ligada al X,

hipogammaglobulinemia y afecciones de inmunidad deprimida adquirida (inmunodeficiencias secundarias), que caracterizan niveles bajos de anticuerpos; en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias; y en el tratamiento de infecciones agudas. La IGIV se administra como una terapia de sustitución de proteínas plasmáticas (IgG) para pacientes inmunodeficientes, tales como personas con fibrosis quística o lupus, que tienen capacidades de producción de anticuerpos disminuidas o suprimidas. En estos pacientes inmunodeficientes, la IGIV derivada de los animales desvelados en el presente documento puede administrarse para mantener niveles de anticuerpos desvelados para prevenir infecciones y conferir una inmunidad pasiva.

Una IGIV específica para un antígeno particular o selección de antígenos se desvela en el presente documento. Una IGIV tal se desvela en una dosis al menos suficiente para proporcionar inmunidad pasiva durante una semana, o durante al menos dos semanas, o durante al menos tres semanas, o durante al menos cuatro semanas. La IGIV puede ser una IGIV completamente humana. En algunas realizaciones de la divulgación, solo una célula o tejido u órgano del animal se utiliza.

Métodos de preparación de animales genéticamente modificados

Preparación de células genéticamente modificadas

Puede prepararse un ungulado, tal como un cerdo o una vaca, por un método desvelado en el presente documento. Para producir los animales inmunodeficientes descritos en el presente documento, se desvelan células que se han modificado genéticamente para inactivar al menos un locus de inmunoglobulina, y en particular un locus de inmunoglobulina en la cadena pesada, y lo más particularmente un locus de inmunoglobulina en una región de unión de una cadena pesada. Ambos alelos de la región de unión de la cadena pesada pueden haber sido alterados en las células.

Pueden obtenerse células de animales que pueden modificarse genéticamente a partir de una variedad de diferentes órganos y tejidos tales como, pero no se limitan a, piel, mesénquima, pulmón, páncreas, corazón, intestino, estómago, vejiga, vasos sanguíneos, riñón, uretra, órganos reproductores, y una preparación desagregada de un embrión completo o parte de un embrión, feto o animal adulto. Pueden seleccionarse células del grupo que consiste en, pero no se limita a, células epiteliales, células de fibroblasto, células neurales, queratinocitos, células hematopoyéticas, melanocitos, condrocitos, linfocitos (B y T), macrófagos, monocitos, células mononucleares, células de músculo cardíaco, otras células de músculo, células granulosa, células del cúmulo, células epidérmicas, células endoteliales, células de islotes de Langerhans, glóbulos sanguíneos, células precursoras de la sangre, células óseas, células precursoras de hueso, citoblastos neuronales, citoblastos primordiales, citoblastos adultos, hepatocitos, queratinocitos, células endoteliales de la vena umbilical, células endoteliales aórticas, células endoteliales microvasculares, fibroblastos, células estrelladas del hígado, células de músculo liso aórtico, miocitos cardíacos, neuronas, células de Kupffer, células de músculo liso, células de Schwann y células epiteliales, eritrocitos, plaquetas, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, adipocitos, condrocitos, células pancreáticas de los islotes, células tiroideas, células paratiroides, células parótidas, células tumorales, células de la glía, astrocitos, glóbulos rojos, glóbulos blancos, macrófagos, células epiteliales, células somáticas, células pituitarias, células suprarrenales, células pilosas, células de la vejiga, de riñón, células retinianas, células de los bastones, células de los conos, células del corazón, células de los nódulos sinusales, células del bazo, células presentadoras de antígeno, células de memoria, linfocitos T, linfocitos B, células plasmáticas, células de músculo, células de ovario, células uterinas, células de próstata, células epiteliales vaginales, espermatozoides, células testiculares, células germinativas, óvulos, células de Leydig, células peritubulares, células de Sertoli, células luteínicas, células cervicales, células endometriales, células mamarias, células foliculares, células mucosas, células ciliadas, células epiteliales no queratinizadas, células epiteliales queratinizadas, células de pulmón, células caliciformes, células epiteliales columnares, células epiteliales escamosas, osteocitos, osteoblastos y osteoclastos. Pueden usarse citoblastos embrionarios.

Las células pueden ser fibroblastos o células tipo fibroblasto que tienen una morfología o un fenotipo que no es distinguible de fibroblastos, o una vida antes de la senescencia de al menos 10 o al menos 12 o al menos 14 o al menos 18 o al menos 20 días, o una vida suficiente para permitir la recombinación homóloga y transferencia nuclear de un núcleo no senescente; las células pueden ser fibroblastos fetales. Las células de fibroblastos son un tipo de célula somática adecuada debido a que pueden obtenerse de fetos en desarrollo y animales adultos en grandes cantidades. Estas células pueden propagarse fácilmente *in vitro* con un tiempo de duplicación rápido y pueden propagarse clónicamente para su uso en procedimientos que eligen genes como diana.

Los genes de inmunoglobulina pueden ser genéticamente elegidos como diana en células mediante recombinación homóloga. La recombinación homóloga permite modificaciones específicas de sitio en genes endógenos y así pueden manipularse novedosas alteraciones en el genoma. En la recombinación homóloga, el ADN entrante interacciona con y se integra en un sitio en el genoma que contiene una secuencia de ADN sustancialmente homóloga. En la integración no homóloga ("aleatoria" o "ilícita"), el ADN entrante no se encuentra en una secuencia homóloga en el genoma, pero se integra en cualquier parte, en una de un gran número de posibles localizaciones. En general, estudios con células eucariotas superiores han revelado que la frecuencia de recombinación homóloga es mucho menor a la frecuencia de integración aleatoria. La relación de estas frecuencias tiene implicaciones

directas para la “elección de diana génica” que dependen de la integración mediante recombinación homóloga (es decir, recombinación entre el “ADN que elige diana” exógeno y el “ADN diana” correspondiente en el genoma). Varios documentos describen el uso de recombinación homóloga en células de mamífero. Ilustrativos de estos documentos son Kucherlapati et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3153-3157, 1984; Kucherlapati et al., *Mol. Cell. Bio.* 5:714-720, 1985; Smithies et al., *Nature* 317:230-234, 1985; Wake et al., *Mol. Cell. Bio.* 8:2080-2089, 1985; Ayares et al., *Genetics* 111:375-388, 1985; Ayares et al., *Mol. Cell. Bio.* 7:1656-1662, 1986; Song et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6820-6824, 1987; Thomas et al., *Cell* 44:419-428, 1986; Thomas y Capecchi, *Cell* 51: 503-512, 1987; Nandi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3845-3849, 1988; y Mansour et al., *Nature* 336:348-352, 1988. Evans y Kaufman, *Nature* 294:146-154, 1981; Doetschman et al., *Nature* 330:576-578, 1987; Thomas y Capecchi, *Cell* 51:503-512, 1987; Thompson et al., *Cell* 56:316-321, 1989.

Puede usarse recombinación homóloga para inactivar un gen de inmunoglobulina en células, tales como las células descritas anteriormente. El ADN puede comprender al menos una porción del (de los) gen(es) en el sitio particular con introducción de una alteración en al menos una, opcionalmente ambas copias, del (de los) gen(es) nativo(s), de manera que se prevenga la expresión de inmunoglobulina funcional. La alteración puede ser una inserción, delección, sustitución o combinación de las mismas. Cuando la alteración se introduce en solo una copia del gen que se inactiva, las células que tienen una única copia no mutada del gen diana se amplifican y pueden someterse a una segunda etapa de elección de diana, en la que la alteración puede ser igual o diferente de la primera alteración, normalmente diferente, y si participa una delección, o sustitución, puede ser solapante al menos una porción de la alteración originalmente introducida. En esta segunda etapa que elige diana puede usarse un vector que elige diana con los mismos brazos de homología, pero que contiene marcadores de selección de mamífero diferentes. Los transformantes resultantes se criban para la ausencia de un antígeno diana funcional y el ADN de la célula puede cribarse adicionalmente para garantizar la ausencia de un gen diana no mutante.

Las construcciones de vector que eligen diana de ácido nucleico pueden diseñarse para realizar la recombinación homóloga en células. Puede diseñarse un vector que elige diana usando una “trampa de poli(A)”. A diferencia de una trampa de promotor, un vector de trampa de poli(A) captura un espectro más ancho de genes que incluye aquellos no expresados en la célula diana (es decir, fibroblastos o células ES). Un vector de trampa de poliA incluye un promotor constitutivo que conduce la expresión de un gen marcador de selección que carece de una señal de poliA. La sustitución de la señal de poliA es un sitio de donante de corte y empalme diseñado para cortar y empalmar en exones aguas abajo. En esta estrategia, el ARNm del gen marcador de selección puede estabilizarse tras el atrapamiento de una señal de poliA de un gen endógeno independientemente de su estado de expresión en las células diana. Puede construirse un vector que elige diana que incluye un marcador de selección que es deficiente en señales para la poliadenilación. Un brazo que elige diana o de recombinación del vector (que flanquea un lado del marcador de selección) incluye al menos una porción de un intrón de JH (tal como el intrón de JH con respecto a C μ).

Estos vectores que eligen diana pueden introducirse en células de mamífero por cualquier método adecuado que incluye, pero no se limita a, transfección, transformación, transducción mediada por virus o infección con un vector viral para elegir como diana los genes de la cadena pesada, cadena ligera kappa o cadena ligera lambda del ungulado mediante recombinación homóloga. Los vectores que eligen diana pueden contener un brazo de recombinación 3' y un brazo de recombinación 5' (es decir, secuencia flanqueante) que es homólogo a la secuencia genómica de la región del ungulado de interés, y en particular, la región de unión de la cadena pesada. Pueden diseñarse brazos de recombinación 3' y 5' de forma que flanqueen los extremos 3' y 5' de al menos una región variable, de unión, de diversidad y/o constante funcional de la secuencia genómica. La elección como diana de una región funcional puede convertirla en inactiva, que produce la incapacidad de la célula para producir moléculas funcionales de inmunoglobulina. La secuencia de ADN homóloga puede incluir una o más secuencias de intrón y/o exón. Además de las secuencias de ácidos nucleicos, el vector de expresión puede contener secuencias de marcador de selección, tales como, por ejemplo, secuencias de genes de proteína verde fluorescente potenciada (eGFP), secuencias de iniciación y/o potenciadoras, secuencias de la cola de poli A, y/o secuencias de ácidos nucleicos que proporcionan la expresión de la construcción en células huésped procariontas y/o eucariotas. El marcador de selección puede localizarse entre la secuencia del brazo de recombinación 5' y 3'.

La modificación de un sitio elegido como diana de una célula puede producirse introduciendo ADN en las células, en las que el ADN tiene homología con el sitio diana e incluye un gen marcador, que permite la selección de células que comprenden la construcción integrada. El ADN homólogo en el vector diana se recombinará con el ADN cromosómico en el sitio diana. El gen marcador puede flanquearse en ambos lados por secuencias de ADN homólogas, un brazo de recombinación en 3' y un brazo de recombinación en 5'. Se han descrito en la materia métodos para la construcción de vectores que eligen diana, véase, por ejemplo, Dai et al., *Nature Biotechnology* 20: 251-255, 2002; documento WO 00/51424.

Pueden prepararse diversas construcciones para la recombinación homóloga en un sitio diana. La construcción puede incluir al menos 50 pb, 100 pb, 500 pb, 1 kbp, 2 kbp, 4 kbp, 5 kbp, 10 kbp, 15 kbp, 20 kbp o 50 kbp, de secuencia homóloga al sitio diana. La secuencia puede incluir cualquier secuencia contigua de un gen de inmunoglobulina.

Pueden suponerse diversas consideraciones en la determinación del grado de homología de secuencias de ADN diana, tales como, por ejemplo, el tamaño del sitio diana, disponibilidad de secuencias, eficiencia relativa de eventos de entrecruzamientos dobles en el sitio diana y la similitud de la secuencia diana con otras secuencias. El ADN que elige diana puede incluir una secuencia en la que el ADN sustancialmente isogénico flanquea las modificaciones de secuencia deseadas con una secuencia diana correspondiente en el genoma que va a modificarse. La secuencia sustancialmente isogénica puede ser al menos aproximadamente el 95 %, o al menos aproximadamente el 97 % o al menos aproximadamente el 98 % o al menos aproximadamente el 99 %, o entre el 95 y el 100 %, 97-98 %, 99,0-99,5 %, 99,6-99,9 % o el 100 % idéntica a la secuencia diana correspondiente (excepto por las modificaciones de secuencia deseadas). El ADN que elige diana y el ADN diana pueden compartir estiramientos de ADN de al menos aproximadamente 75, 150 ó 500 pares de bases que son el 100 % idénticos. Por consiguiente, el ADN que elige diana puede derivarse de células estrechamente relacionadas con la línea celular que se elige como diana; o el ADN que elige diana puede derivarse de células de la misma línea celular o animal que las células que se eligen como diana.

Se desvelan vectores que eligen diana que dirigen el locus de la cadena pesada porcina. El vector que elige diana puede contener brazos de recombinación 5' y 3' que contienen secuencia homóloga a la secuencia flanqueante de 3' y 5' de la región J6 de la cadena pesada porcina del sitio de inmunoglobulina. Como la región J6 es la única región de unión funcional de la cadena pesada porcina del locus de inmunoglobulina, ésta prevendrá la expresión de una inmunoglobulina de la cadena pesada porcina funcional. El vector que elige diana puede contener un brazo de recombinación 5' que contiene secuencia homóloga a la secuencia genómica 5' de la región J6, opcionalmente que incluye J1-4 y un brazo de recombinación 3' que contiene secuencia homóloga a la secuencia genómica 3' de la región J6, que incluye la región constante mu (una "construcción que se dirige a J6"). Además, esta construcción que se dirige a J6 también puede contener un gen marcador de selección que se localiza entre los brazos de recombinación 5' y 3'. El brazo que se dirige a 5' puede contener la secuencia 5' de J1, J2 y/o J3. El brazo que se dirige a 5' puede contener la secuencia 5' de la región constante. El brazo que se dirige a 3' puede contener la secuencia 3' de la región constante y/o que incluye la región constante. El vector que elige diana puede contener un brazo de recombinación 5' que contiene secuencia homóloga a la secuencia genómica 5' de la región de diversidad, y un brazo de recombinación 3' que contiene secuencia homóloga a la secuencia genómica 3' de la región de diversidad del locus de la cadena pesada porcina. El vector que elige diana puede contener un brazo de recombinación 5' que contiene secuencia homóloga a la secuencia genómica 5' de la región constante mu y un brazo de recombinación 3' que contiene la secuencia homóloga a la secuencia genómica 3' de la región constante mu del locus de la cadena pesada porcina.

Los vectores que eligen diana diseñados para alterar la expresión de genes de la cadena pesada porcinos pueden contener brazos de recombinación, por ejemplo, el brazo de recombinación 3' o 5', que se dirigen a la región constante de la cadena pesada. El brazo de recombinación puede dirigirse a la región constante mu, por ejemplo, las secuencias mu de C descritas anteriormente o como se desvelan en Sun & Butler Immunogenetics (1997) 46: 452-460. El brazo de recombinación puede dirigirse a la región constante delta, tal como la secuencia desvelada en Zhao et al. (2003) J Immunol 171: 1312-1318, o la región constante alfa, tal como la secuencia desvelada en Brown & Butler (1994) Molec Immunol 31: 633-642.

Células que se han transfectado o recibido de otro modo un vector que elige diana apropiado pueden entonces seleccionarse o identificarse mediante análisis de genotipo o de fenotipo. Las células pueden transfectarse, cultivarse en medio apropiadamente seleccionado para identificar células que proporcionan la integración apropiada. La presencia del gen marcador de selección insertado en el gen de inmunoglobulina establece la integración de la construcción diana en el genoma del huésped. Aquellas células que muestran el fenotipo deseado pueden entonces analizarse adicionalmente por análisis de restricción, electroforesis, análisis de Southern, reacción en cadena de la polimerasa, etc., para analizar el ADN con el fin de establecer si se produjo recombinación homóloga o no homóloga. Esto puede determinarse empleando sondas para el inserto y secuenciando a continuación las regiones de 5' y 3' que flanquean el inserto para la presencia del gen de inmunoglobulina que se extiende más allá de las regiones flanqueantes de la construcción o identificando la presencia de una delección, cuando se introduce tal delección. También pueden usarse cebadores que son complementarios a una secuencia dentro de la construcción y complementarios a una secuencia fuera de la construcción y en el sitio diana. De esta forma, solo pueden obtenerse dúplex de ADN que tienen ambos cebadores presentes en las cadenas complementarias si se ha producido la recombinación homóloga. Demostrando la presencia de las secuencias de cebadores o la secuencia de tamaño esperada, se soporta la aparición de recombinación homóloga.

La reacción en cadena de la polimerasa usada para cribar eventos de recombinación homóloga se conoce en la técnica, véanse, por ejemplo, Kim y Smithies, Nucleic Acids Res. 16:8887-8903, 1988; y Joyner et al., Nature 338:153-156, 1989. Se ha mostrado que la combinación específica de un potenciador del poliovirus mutante y un promotor de timidina cinasa para conducir el gen neomicina es activa en tanto embriocitoblastos como células EC por Thomas y Capecchi, arriba, 1987; Nicholas y Berg (1983) en Teratocarcinoma Stem Cell. Siver, Martin y Strikland (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y. (pp. 469-497); y Linney y Donerly, Cell 35:693-699, 1983.

Pueden identificarse células que se ha sometido a recombinación homóloga por varios métodos. El método de

selección puede detectar el agotamiento del gen de inmunoglobulina directamente, tanto debido a la inactivación elegida como diana del gen de inmunoglobulina por recombinación homóloga como a una mutación en el gen que produce una inmunoglobulina no funcionante o no expresada. La selección mediante resistencia a antibióticos se ha usado más comúnmente para el cribado (véase anteriormente). Este método puede detectar la presencia del gen de resistencia sobre el vector que elige diana, pero no indica directamente si la integración fue un evento de recombinación elegida como diana o una integración aleatoria. Alternativamente, el marcador puede ser un gen marcador fluorescente tal como GFP o RFP, o un gen que es detectable sobre la superficie celular mediante clasificación de células o análisis de FAC. Cierta tecnología, tal como poli A y tecnología de trampa de promotor, aumentan la probabilidad de eventos elegidos como diana, pero de nuevo, no dan evidencia directa de que se haya logrado el fenotipo deseado, una célula deficiente en expresión del gen de inmunoglobulina. Además, pueden usarse formas negativas de selección para seleccionar la integración elegida como diana; en estos casos, el gen para un factor letal para las células (por ejemplo, Tk o toxina de la difteria A) se inserta de tal forma que solo eventos elegidos como diana permitan a la célula evitar la muerte. Las células seleccionadas por estos métodos pueden entonces ensayarse para la alteración de genes, integración de vectores y, finalmente, agotamiento del gen de inmunoglobulina. En estos casos, como la selección se basa en la detección de la integración de vectores que eligen diana y no en el fenotipo alterado, solo pueden detectarse las inactivaciones elegidas como diana, no las mutaciones puntuales, transposiciones o truncaciones de genes u otras modificaciones tales.

Pueden caracterizarse adicionalmente células de animales que se cree que carecen de expresión de genes de inmunoglobulina funcionales. Tal caracterización puede llevarse a cabo por las siguientes técnicas, que incluyen, pero no se limitan a: análisis por PCR, análisis de transferencia Southern, análisis de transferencia Northern, ensayos de unión a lectina específicos y/o análisis de secuenciación. También puede llevarse a cabo caracterización fenotípica, que incluye probar la expresión de IgG, IgM o IgA porcina uniendo anticuerpos anti-ratón en diversos ensayos que incluyen inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, ensayos de ELISA, citometría de flujo, transferencia Western, probar para transcripción de Ig en células tales como por RT-PCR.

Puede usarse análisis por PCR como se describe en la materia para determinar la integración de vectores que eligen diana. Pueden originarse amplímeros en el gen de resistencia a antibióticos y extenderse en una región fuera de la secuencia del vector. También puede usarse análisis Southern para caracterizar modificaciones macroscópicas en el locus, tales como la integración de un vector que elige diana en el locus de inmunoglobulina. Mientras tanto, puede usarse análisis Northern para caracterizar el transcrito producido a partir de cada uno de los alelos. Además, el análisis de secuenciación del ADNc producido a partir del transcrito de ARN también puede usarse para determinar la localización precisa de cualquier mutación en el alelo de inmunoglobulina.

Producción de animales genéticamente modificados

Pueden producirse animales que contienen las modificaciones genéticas descritas en el presente documento por cualquier método conocido para un experto en la materia, pero normalmente se producen usando células tales como aquellas descritas anteriormente. Métodos para producir animales con modificaciones genéticas incluyen, pero no se limitan a: transferencia nuclear, inyección intracitoplasmática de espermatozoides, modificación de cigotos directamente (por ejemplo, por microinyección pronuclear), inyección de blastocistos usando citoblastos embrionarios y transferencia génica mediada por espermatozoides. Normalmente, un método para producir tales animales por transferencia nuclear, por ejemplo, cerdos, incluye: desnuclear un ovocito, fusionar el ovocito con un núcleo de donante de una célula en la que al menos un alelo de al menos un gen de inmunoglobulina se ha inactivado, e implantar el embrión derivado de la transferencia nuclear en una madre de alquiler.

Alternativamente, se desvela un método para producir animales viables que carecen de cualquier expresión de inmunoglobulina funcional inactivando ambos alelos del gen de inmunoglobulina en citoblastos embrionarios, que pueden entonces usarse para producir descendencia. También se desvela un método para producir animales viables, tales como cerdos, en el que ambos alelos del gen de inmunoglobulina se han inactivado. Los animales pueden producirse clonando usando un núcleo de donante de una célula en la que ambos alelos del gen de inmunoglobulina se han inactivado. Ambos alelos del gen de inmunoglobulina pueden inactivarse mediante un evento de elección de diana genética.

Pueden crearse animales genéticamente alterados modificando cigotos directamente. Para mamíferos, los cigotos modificados pueden entonces introducirse en el útero de una hembra pseudopreñada que puede llevar el animal a término. Por ejemplo, si se desean animales completos que carecen de un gen de inmunoglobulina, entonces embriocitoblastos derivados de ese animal pueden elegirse como diana y después introducirse en blastocistos para cultivar las células modificadas en animales quiméricos. Para embriocitoblastos, puede usarse tanto una línea de embriocitoblastos como citoblastos recientemente obtenidos. Las células totipotentes pueden ser embriocitoblastos (ES). El aislamiento de células ES de blastocistos, el establecimiento de líneas de células ES y su posterior cultivo se llevan a cabo por métodos convencionales como se describen, por ejemplo, por Doetschmann et al., J. Embryol. Exp. Morph. 87:27-45 (1985); Li et al., Cell 69:915-926 (1992); Robertson, E. J. "Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach", ed. E. J. Robertson, IRL Press, Oxford, England (1987); Wurst y Joyner, "Gene Targeting: A Practical Approach", ed. A. L. Joyner, IRL Press, Oxford, England (1993); Hogen et al., "Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual", eds. Hogan, Beddington, Costantini y Lacy, Cold Spring Harbor

Laboratory Press, New York (1994); y Wang et al., Nature 336:741-744 (1992). Las células totipotentes pueden ser células germinativas embrionarias (EG). Las células germinativas embrionarias son células indiferenciadas funcionalmente equivalentes a células ES, es decir, pueden cultivarse y transfectarse *in vitro*, entonces contribuyen a linajes de células somáticas y germinativas de una quimera (Stewart et al., Dev. Biol. 161:626-628 (1994)). Las células EG se derivan por cultivo de células germinativas primordiales, los progenitores de los gametos, con una combinación de factores de crecimiento: factor inhibidor de leucemia, factor Steel y factor de crecimiento de fibroblastos básico (Matsui et al., Cell 70:841-847 (1992); Resnick et al., Nature 359:550-551 (1992)). El cultivo de células EG puede llevarse a cabo usando métodos descritos en el artículo por Donovan et al., "Transgenic Animals, Generation and Use", Ed. L. M. Houdebine, Harwood Academic Publishers (1997), y en la bibliografía original citada en su interior.

Pueden obtenerse blastocistos tetraploides por producción y desarrollo de cigotos naturales, o por métodos conocidos por electrofusión de embriones bicelulares y posteriormente cultivarse como se describe, por ejemplo, por James et al., Genet. Res. Camb. 60:185-194 (1992); Nagy y Rossant, "Gene Targeting: A Practical Approach", ed. A. L. Joyner, IRL Press, Oxford, England (1993); o por Kubiak y Tarkowski, Exp. Cell Res. 157:561- 566 (1985).

La introducción de las células ES o células EG en los blastocistos puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica. Un método adecuado es el método de microinyección como se describe por Wang et al., EMBO J. 10:2437-2450 (1991).

Puede usarse transferencia génica mediada por espermatozoides para producir los ungulados genéticamente modificados descritos en el presente documento. Los métodos y composiciones descritos en el presente documento para tanto eliminar la expresión de genes de inmunoglobulina endógenos como para insertar genes de inmunoglobulina xenógenos pueden usarse para modificar genéticamente los espermatozoides mediante cualquier técnica descrita en el presente documento o conocida en la técnica. El espermatozoide genéticamente modificado puede entonces usarse para impregnar un receptor femenino mediante inseminación artificial, inyección intracitoplasmática de espermatozoides o cualquier otra técnica conocida. El espermatozoide y/o la cabeza del espermatozoide pueden incubarse con el ácido nucleico exógeno durante un periodo de tiempo suficiente. Periodos de tiempo suficientes incluyen, por ejemplo, aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 5 minutos, normalmente aproximadamente 45 segundos a aproximadamente 3 minutos, más normalmente aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 2 minutos. La expresión de genes de inmunoglobulina xenógenos, tales como humanos, en ungulados como se describe en el presente documento puede llevarse a cabo mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides. El posible uso de espermatozoides como vectores para transferencia génica se sugirió por primera vez por Brackett et al., Proc., Natl. Acad. Sci. USA 68:353-357 (1971). Esto fue seguido de informes de la producción de ratones transgénicos y cerdos después de la fecundación *in vitro* de ovocitos con espermatozoides que se había incubado por ADN desnudo (véanse, por ejemplo, Lavitrano et al., Cell 57:717-723 (1989) y Gandolfi et al., Journal of Reproduction and Fertility Abstracts Series 4, 10 (1989)), aunque otros laboratorios no fueron capaces de repetir estos experimentos (véanse, por ejemplo, Brinster et al. Cell 59:239-241 (1989) y Gavora et al., Canadian Journal of Animal Science 71:287-291 (1991)). Desde entonces ha habido varios informes de transferencia génica mediada por espermatozoides satisfactoria en pollo (véase, por ejemplo, Nakanishi e Iritani, Mol. Reprod. Dev. 36:258-261 (1993)); ratones (véase, por ejemplo, Maione, Mol. Reprod. Dev. 59:406 (1998)); y cerdos (véanse, por ejemplo, Lavitrano et al. Transplant. Proc. 29:3508-3509 (1997); Lavitrano et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:14230-5 (2002); Lavitrano et al., Mol. Reprod. Dev. 64:284-91 (2003)). También se describen técnicas similares en la patente de EE.UU. N° 6.376.743; concedida el 23 de abril de 2002; las publicaciones de patente de EE.UU. N° 20010044937, publicada el 22 de noviembre de 2001, y 20020108132, publicada el 8 de agosto de 2002.

Puede usarse inyección intracitoplasmática de espermatozoides para producir los ungulados genéticamente modificados descritos en el presente documento. Esto puede llevarse a cabo co-insertando un ácido nucleico exógeno y un espermatozoide en el citoplasma de un ovocito sin fecundar para formar un ovocito fecundado transgénico, y permitir que el ovocito fecundado transgénico se desarrolle en un embrión transgénico y, si se desea, en una descendencia viva. El espermatozoide puede ser una cabeza de espermatozoide de membrana rota o una cabeza de espermatozoide desmembrada. La etapa de co-inserción puede incluir la subetapa de preincubar el espermatozoide con el ácido nucleico exógeno durante un periodo de tiempo suficiente, por ejemplo, aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 5 minutos, normalmente aproximadamente 45 segundos a aproximadamente 3 minutos, más normalmente aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 2 minutos. La co-inserción del espermatozoide y el ácido nucleico exógeno en el ovocito puede ser mediante microinyección. El ácido nucleico exógeno mezclado con el espermatozoide puede contener más de un transgén, para producir un embrión que es transgénico para más de un transgén como se describe en el presente documento. La inyección intracitoplasmática de espermatozoides puede llevarse a cabo por cualquier técnica conocida en la técnica, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.376.743. La expresión de genes de inmunoglobulina xenógenos, tales como humanos, en ungulados como se describe en el presente documento, puede llevarse a cabo mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

Puede usarse cualquier técnica adicional conocida en la técnica, o una combinación de diversas técnicas conocidas en la técnica, para introducir transgenes en animales o células. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a,

microinyección pronuclear (véase, por ejemplo, Hoppe, P. C. y Wagner, T. E., 1989, patente de EE.UU. N° 4.873.191); transferencia génica mediada por retrovirus en líneas germinales (véase, por ejemplo, Van der Putten et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82:6148-6152); elección como diana de genes en citoblastos embrionarios (véanse, por ejemplo, Thompson et al., 1989, Cell 56:313-321; Wheeler, M. B., 1994, documento WO 94/26884); electroporación de embriones (véase, por ejemplo, Lo, 1983, Mol. Cell. Biol. 3:1803-1814); pistola de células; transfección; transducción; infección retroviral; infección adenoviral; infección por lentivirus; infección asociada a adenovirus; transferencia génica mediada por liposomas; transferencia de ADN desnudo; y transferencia génica mediada por espermatozoides (véase, por ejemplo, Lavitrano et al., 1989, Cell 57:717-723); etc. Para una revisión de tales técnicas, véase, por ejemplo, Gordon, 1989, Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol. 115:171-229. La expresión de genes de inmunoglobulina xenógenos, tales como humanos, en ungulados como se describe en el presente documento, puede llevarse a cabo mediante estas técnicas o una combinación de las mismas.

Pueden usarse células de ungulado, tales como porcinas o bovinas, que carecen de un alelo, opcionalmente ambos alelos, de un gen de la cadena pesada, cadena ligera kappa y/o cadena ligera lambda de ungulado como células donante para transferencia nuclear en células de receptor para producir animales transgénicos clonados. Alternativamente, pueden crearse inactivaciones de genes de la cadena pesada, cadena ligera kappa y/o cadena ligera lambda del ungulado en citoblastos embrionarios, que luego se usan para producir descendencia.

En el presente documento también se desvela un método para clonar un animal, tal como un cerdo, que carece de un gen de inmunoglobulina funcional mediante transferencia nuclear de células somáticas. Tales animales pueden criarse con otros animales genéticamente modificados, y/o pueden usarse gametos o células de estos animales para modificar adicionalmente o manipular genéticamente el locus de Ig. Por ejemplo, pueden criarse juntos animales genéticamente modificados heterocigóticos para producir animales genéticamente modificados homocigóticos, o pueden modificarse adicionalmente células genéticamente modificadas heterocigóticas para producir células con una modificación genética homocigótica. Las células pueden posteriormente usarse en SCNT para producir un animal genéticamente modificado homocigótico. En general, el animal puede producirse por un proceso de transferencia nuclear que comprende las siguientes etapas: obtener células diferenciadas deseadas que van a usarse como fuente de núcleos donantes; obtener ovocitos del animal; desnuclear dichos ovocitos; transferir la célula diferenciada deseada o núcleo de célula al ovocito desnucleado, por ejemplo, por fusión o inyección, para formar unidades de NT; activar la unidad de NT resultante; y transferir dicha unidad de NT cultivada a un animal huésped de forma que la unidad de NT se desarrolle en un feto. Se conocen técnicas de transferencia nuclear o trasplante nuclear en la técnica (Dai et al. Nature Biotechnology 20:251-255; Polejaeva et al Nature 407:86-90 (2000); Campbell et al, Theriogenology, 43:181 (1995) Campbell, et al., Theriogenology 68 Suppl 1: S214-31 (2007); Vajta, et al., Reprod Fertil Dev 19(2): 403-23 (2007), Collas et al, Mol. Report Dev., 38:264-267 (1994); Keefer et al, Biol. Reprod., 50:935-939 (1994); Sims et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:6143-6147 (1993); documentos WO 94/26884; WO 94/24274 y WO 90/03432, las patentes de EE.UU. N° 4.944.384 y 5.057.420), Vajta G, Trends Biotechnol. Jun;25(6):250-3 (2007)). Un núcleo de célula donante, que se ha modificado para alterar el gen de inmunoglobulina, se transfiere a un ovocito receptor. El uso de este método no se limita a un tipo de célula donante particular. La célula donante puede ser como se describe en el presente documento, véanse, por tanto, por ejemplo, Wilmut et al., Nature 385 810 (1997); Campbell et al., Nature 380 64-66 (1996); Dai et al., Nature Biotechnology 20:251-255, 2002 o Cibelli et al., Science 280 1256-1258 (1998). Pueden emplearse todas las células de cariotipo normal, que incluyen células somáticas embrionarias, fetales y adultas que pueden usarse satisfactoriamente en transferencia nuclear. Los fibroblastos fetales son una clase particularmente útil de células donantes. Métodos generalmente adecuados de transferencia nuclear se describen en Campbell et al Theriogenology 43 181 (1995), Campbell, et al., Theriogenology 68 Suppl 1: S214-31 (2007); Vajta, et al., Reprod Fertil Dev 19(2): 403-23 (2007), Dai et al. Nature Biotechnology 20:251-255, Polejaeva et al Nature 407:86-90 (2000), Collas et al Mol. Reprod. Dev. 38 264-267 (1994), Keefer et al Biol. Reprod. 50 935-939 (1994), Sims et al Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90 6143-6147 (1993), documentos WO-A-9426884, WO-A-9424274, WO-A-9807841, WO-A-9003432, patente de EE.UU. n° 4.994.384 y patente de EE.UU. n° 5.057.420. También pueden usarse células donantes diferenciadas o al menos parcialmente diferenciadas. Las células donantes también pueden estar, pero no tienen que estar, en cultivo y pueden ser quiescentes. Células donantes nucleares que son quiescentes son células que pueden ser inducidas para entrar en quiescencia o existen en un estado quiescente *in vivo*. Los métodos del estado de la técnica también han usado tipos embrionarios de células en procedimientos de clonación (Campbell et al., (Nature, 380:64-68, 1996) y Stice et al., (Biol. Reprod., 20 54:100-110, 1996). Pueden obtenerse células donantes nucleares somáticas de una variedad de órganos y tejidos diferentes tales como, pero no se limitan a, piel, mesénquima, pulmón, páncreas, corazón, intestino, estómago, vejiga, vasos sanguíneos, riñón, uretra, órganos reproductores, y una preparación desagregada de todo o parte de un embrión, feto o animal adulto. Pueden seleccionarse células donantes nucleares del grupo que consiste en células epiteliales, células de fibroblasto, células neurales, queratinocitos, células hematopoyéticas, melanocitos, condrocitos, linfocitos (B y T), macrófagos, monocitos, células mononucleares, células de músculo cardíaco, otras células de músculo, células extendidas, células del cúmulo, células epidérmicas o células endoteliales. La célula donante nuclear puede ser un embriocitoblasto. Pueden usarse células de fibroblastos como células donantes. Las células donantes nucleares pueden ser células germinativas de un animal. Puede usarse cualquier célula germinativa de una especie animal en la fase embrionaria, fetal o adulta como célula donante nuclear. La célula donante nuclear puede ser una célula germinativa embrionaria.

Las células donantes nucleares pueden detenerse en cualquier fase del ciclo celular (G0, G1, G2, S, M) de manera

que se garantice la coordinación con la célula aceptora. Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para manipular la fase del ciclo celular. Métodos para controlar la fase del ciclo celular incluyen, pero no se limitan a, quiescencia de G0 inducida por la inhibición del contacto de células cultivadas, quiescencia de G0 inducida por la eliminación de suero u otro nutriente esencial, quiescencia de G0 inducida por la senescencia, quiescencia de G0 inducida mediante la adición de un factor de crecimiento específico; quiescencia de G0 o G1 inducida por medios físicos o químicos tales como choque térmico, presión hiperbárica u otro tratamiento con una sustancia química, hormona, factor de crecimiento u otra sustancia; control de la fase S mediante tratamiento con un agente químico que interfiere con cualquier punto del procedimiento de replicación; control de la fase M mediante selección usando citometría de flujo activada por fluorescencia, agitación mitótica, tratamiento con agentes de alteración de los microtúbulos o cualquier sustancia química que altere la progresión en la mitosis (véase también Freshney, R. I., "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique", Alan R. Liss, Inc, New York (1983).

Los métodos para el aislamiento de ovocitos son muy conocidos en la técnica. Esencialmente, éstos pueden comprender aislar ovocitos de los ovarios o el conducto reproductor de un animal. Una fuente fácilmente disponible de ovocitos es materiales de matadero. Para la combinación de técnicas tales como ingeniería genética, transferencia nuclear y clonación, los ovocitos deben generalmente madurarse *in vitro* antes de que estas células puedan usarse como células receptoras para la transferencia nuclear, y antes de que puedan fecundarse por el espermatozoide para desarrollarse en un embrión. Este proceso requiere generalmente recoger ovocitos inmaduros (profase I) del ovario del mamífero, por ejemplo, ovarios bovinos o porcinos obtenidos en un matadero, y madurar los ovocitos en un medio de maduración antes de la fecundación o desnucleación hasta que el ovocito alcanza la etapa de metafase II, que en el caso de ovocitos bovinos generalmente se produce aproximadamente 18-24 horas después de la aspiración, y en el caso de ovocitos porcinos generalmente se produce entre 30-48 horas después de la aspiración. Este periodo de tiempo se conoce como el "periodo de maduración". El ovocito puede obtenerse de una cerda primeriza. Una "cerda primeriza" es una cerda hembra que nunca ha tenido descendencia. El ovocito puede obtenerse de cerda. Una "cerda" es el cerdo hembra que ha producido previamente descendencia. Un ovocito de la etapa de metafase II puede ser el ovocito receptor, se cree que en esta etapa el ovocito puede ser o está suficientemente "activado" para tratar el núcleo introducido como lo hace un semen fecundante. Se han usado satisfactoriamente ovocitos en la etapa de metafase II, que se han madurado *in vivo*, en técnicas de transferencia nuclear. Esencialmente, pueden recogerse quirúrgicamente ovocitos de la metafase II maduros de tanto animal no superovulado como superovulado 35 a 48, o 39-41, horas después de la aparición del celo o después de la inyección de gonadotropina coriónica humana (hCG) u hormona similar. El ovocito puede ponerse en un medio apropiado, tal como una disolución de hialuronidasa.

Después de un periodo de maduración de tiempo fijo, que oscila de aproximadamente 30 a 60 horas, o de aproximadamente 35 a 55 horas o de aproximadamente 40 a 55 horas o aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55 horas, los ovocitos pueden desnuclearse. Antes de la desnucleación, los ovocitos pueden sacarse y ponerse en un medio apropiado, tal como HECM que contiene 1 miligramo por mililitro de hialuronidasa antes de sacar las células del cúmulo. Los ovocitos desnudados pueden entonces cribarse para cuerpos polares, y los ovocitos de metafase II seleccionados, como se ha determinado por la presencia de cuerpos polares, se usan entonces para transferencia nuclear. Sigue la desnucleación.

La desnucleación puede realizarse por métodos conocidos, tal como se describen en la patente de EE.UU. n° 4.994.384. Por ejemplo, pueden ponerse ovocitos de metafase II en tanto HECM, que contiene opcionalmente 7,5 microgramos por mililitro de citocalasina B, para desnucleación inmediata, o pueden ponerse en un medio adecuado, por ejemplo, un medio de cultivo de embriones tal como CR1aa, más 10 % de suero de vaca en celo, y a continuación desnuclearse después, tal como no más de 24 horas después, o no más de 16-18 horas después. La desnucleación puede llevarse a cabo microquirúrgicamente usando una micropipeta para eliminar el cuerpo polar y el citoplasma adyacente. Los ovocitos pueden entonces cribarse para identificar aquellos que se han desnucleado satisfactoriamente. Una forma de cribar los ovocitos es teñir los ovocitos con 1 microgramo por mililitro de colorante 33342 Hoechst en HECM, y entonces visualizar los ovocitos bajo irradiación ultravioleta no menos de 10 segundos. Los ovocitos que se han desnucleado satisfactoriamente pueden entonces ponerse en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, CR1aa más 10 % de suero, o TCM199 tamponado con HEPES o NCSU23.

Una única célula de mamífero de la misma especie que el ovocito desnucleado puede entonces transferirse al espacio perivitelino del ovocito desnucleado usado para producir la unidad de NT. Pueden usarse la célula de mamífero y el ovocito desnucleado para producir unidades de NT según métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden fusionarse por electrofusión. La electrofusión se lleva a cabo proporcionando un pulso de electricidad que es suficiente para producir una rotura transitoria de la membrana plasmática. Esta rotura de la membrana plasmática es muy corta debido a que la membrana se vuelve a formar rápidamente. Así, si dos membranas adyacentes son inducidas para romperse y tras volver a formarse se entremezclan las bicapas de lípido, pueden abrirse pequeños canales entre las dos células. Debido a la inestabilidad termodinámica de una abertura tan pequeña, se agranda hasta que las dos células se vuelven una. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.997.384 por Prather et al. Pueden usarse una variedad de medios de electrofusión que incluyen, por ejemplo, sacarosa, manitol, sorbitol y disolución tamponada con tampón. También puede llevarse a cabo fusión usando virus de Sendai como agente fusogénico (Graham, Wister Inot. Symp. Monogr., 9, 19, 1969). Por tanto, el núcleo pueden inyectarse directamente en el ovocito en vez de usando fusión por electroporación. Véase, por ejemplo, Collas y

Barnes, Mol. Reprod. Dev., 38:264-267 (1994). Después de la fusión, las unidades de NT fusionadas resultantes se ponen entonces en un medio adecuado hasta la activación, por ejemplo, medio CR1aa, TCM199 tamponado con HEPES o NCSU23. La activación puede efectuarse poco después, por ejemplo menos de 24 horas después, o aproximadamente 4-9 horas después, o óptimamente 1-2 horas después de la fusión. La activación puede producirse al menos una hora después de la fusión y 40-41 horas después de la maduración.

La unidad de NT puede activarse por métodos conocidos. Tales métodos incluyen, por ejemplo, cultivar la unidad de NT a temperatura sub-fisiológica, en esencia aplicando un choque de temperatura frío, o en realidad fresco, a la unidad de NT. Esto puede hacerse lo más convenientemente cultivando la unidad de NT a temperatura ambiente, que es fría con respecto a las condiciones de temperatura fisiológica a las que los embriones se exponen normalmente. Alternativamente, la activación puede lograrse por aplicación de agentes de activación conocidos. Por ejemplo, se ha mostrado que la penetración de ovocitos por semen durante la fecundación activa la ovocitos de prefusión dando mayores números de embarazos viables y múltiples terneros genéticamente idénticos después de la transferencia nuclear. Por tanto, pueden usarse tratamientos tales como choque eléctrico y químico para activar embriones de NT después de la fusión. Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.496.720 concedida a Susko-Parrish et al. La fusión y activación puede inducirse por la aplicación de un pulso de CA de 5 V durante 5 s seguido de dos pulsos de CC de 1,5 kV/cm durante 60 µs usando cada uno un pulso de CA ECM2001 Electrocult Manipulator (BTX Inc., San Diego, Calif). Adicionalmente, la activación puede efectuarse aumentando simultáneamente o secuencialmente los niveles de cationes divalentes en el ovocito, y reduciendo la fosforilación de proteínas celulares en el ovocito. Esto puede efectuarse generalmente introduciendo cationes divalentes en el citoplasma del ovocito, por ejemplo, magnesio, estroncio, bario o calcio, por ejemplo, en forma de un ionóforo. Otros métodos de aumentar los niveles de cationes divalentes incluyen el uso de choque eléctrico, tratamiento con etanol y tratamiento con quelantes enjaulados. La fosforilación puede reducirse por métodos conocidos, por ejemplo, mediante la adición de inhibidores de cinasas, por ejemplo, inhibidores de serina-treonina cinasas, tales como 6-dimetil-aminopurina, estaurosporina, 2-aminopurina y esfingosina. Alternativamente, puede inhibirse la fosforilación de proteínas celulares por introducción de una fosfatasa en el ovocito, por ejemplo, fosfatasa 2A y fosfatasa 2B.

Las unidades de NT activadas, o "embriones fusionados", pueden entonces cultivarse en un medio de cultivo *in vitro* adecuado hasta la generación de colonias de células. Medios de cultivo adecuados para el cultivo y la maduración de embriones son muy conocidos en la técnica. Ejemplos de medios conocidos, que pueden usarse para el cultivo y mantenimiento de embriones, incluyen Ham's F-10 + 10 % de suero de ternero fetal (FCS), medio de cultivo de tejido-199 (TCM-199) + 10 % de suero de ternero fetal, Tyrodes-albúmina-lactato-piruvato (TALP), solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS), medios de Eagle y de Whitten, y, en un ejemplo específico, las unidades de NT activadas pueden cultivarse en medio NCSU-23 durante aproximadamente 1-4 h a aproximadamente 38,6 °C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO₂. Después, la unidad o unidades de NT cultivadas pueden lavarse y a continuación ponerse en un medio adecuado contenido en placas de pocillos que pueden contener una capa alimentadora confluyente adecuada. Capas alimentadoras adecuadas incluyen, a modo de ejemplo, fibroblastos y células epiteliales. Las unidades de NT se cultivan sobre la capa alimentadora hasta que las unidades de NT alcanzan un tamaño adecuado para transferirlas a una hembra receptora, o para obtener células que pueden usarse para producir colonias de células. Estas unidades de NT pueden cultivarse hasta al menos aproximadamente 2 a 400 células, aproximadamente 4 a 128 células, o al menos aproximadamente 50 células. Las unidades NT pueden transferirse directamente a una hembra receptora, sin ningún cultivo *in vitro* adicional.

Las unidades de NT activadas pueden entonces transferirse (transferencias de embriones), 0-144 horas después de la activación, al oviducto de un cerdo hembra. Los cerdos hembra pueden ser una cerda primeriza receptora de celo sincronizado. Pueden usarse cerdas primerizas cruzadas (blancas grandes/Duroc/Landrace) (280-400 lbs). Las cerdas primerizas pueden sincronizarse como animales receptores para la administración por vía oral de 18-20 mg de Regu-Mate (Altrenogest, Hoechst, Warren, N.J.) mezclado en el pienso. Regu-Mate puede alimentarse durante 14 días consecutivos. Mil unidades de gonadotropina coriónica humana (hCG, Intervet America, Millsboro, Del.) pueden entonces administrarse i.m. aproximadamente 105 h después del último tratamiento con Regu-Mate. Entonces pueden realizarse transferencias de embriones aproximadamente 22-26 h después de la inyección de hCG. Para mejorar los desenlaces de la transferencia de embriones, pueden emplearse diversas estrategias, por ejemplo, administración de hormonas al receptor, o co-transferencia de embriones partenogénicos (véase King, T. J., et al.). Reproduction 123(4): 507-15 (2002). El embarazo puede llevarse a término y producir el parto de descendencia viva. Alternativamente, el embarazo puede terminarse pronto y pueden recogerse células embrionarias o fetales.

Los animales también pueden manipularse adicionalmente. Por ejemplo, los animales pueden cruzarse con animales del mismo genotipo o diferente, y los animales resultantes son deficientes en linfocitos B. Los animales también pueden usarse para obtener donantes nucleares para transferencia nuclear adicional. Los animales pueden usarse para desarrollar células que pueden manipularse genéticamente adicionalmente y entonces usarse como donantes nucleares. Éstas pueden ser células somáticas tales como fibroblasto.

Modificaciones genéticas adicionales

Animales o células que carecen de expresión de inmunoglobulina funcional producida según el proceso, secuencias

y/o construcciones descritas en el presente documento pueden contener modificaciones genéticas adicionales para eliminar la expresión de xenoantígenos. Tales animales pueden modificarse adicionalmente para eliminar la expresión de al menos un alelo del gen de alfa-1,3-galactosiltransferasa, el gen de CMP-Neu5Ac hidroxilasa (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. 2005-0223418), el gen de iGb3 sintasa (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. 2005-0155095) y/o el gen de sintasa de Forssman (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. 2006-0068479). Los animales desvelados en el presente documento también pueden contener modificaciones genéticas para expresar fucosiltransferasa y/o sialiltransferasa, genes inhibidores de la vía del complemento (CD55, CD59, CD46), genes que expresan efectos moduladores de linfocitos T tales como CTLA4-Ig, o un inhibidor negativo dominante del MHC de clase II (CIITA), u otros genes que modulan la expresión de la función inmunitaria mediada por linfocitos B o linfocitos T. Tales animales pueden modificarse adicionalmente para eliminar la expresión de genes que afectan la función inmunitaria. Por ejemplo, genes que han sido inactivados en ratones para producir un fenotipo inmunodeprimido pueden clonarse y alterarse por elección de diana génica en cerdos. Algunos genes que han sido elegidos como diana en ratones y pueden ser elegidos como diana para producir cerdos inmunodeprimidos incluyen beta 2-microglobulina (deficiencia de clase I del MHC, Koller et al., Science, 248:1227-1230), TCR Alfa, TCR Beta (Mombaerts et al., Nature, 360:225-231), RAG-1 y RAG-2 (Mombaerts et al., (1992) Cell 68, 869-877, Shinkai, et al., (1992) Cell 68, 855-867, documento US 5859307). Para lograr estas modificaciones genéticas adicionales, pueden modificarse células para contener múltiples modificaciones genéticas. Alternativamente, los animales pueden cruzarse juntos para lograr múltiples modificaciones genéticas. Animales, tales como cerdos, que carecen de expresión de inmunoglobulina funcional, producidos según el proceso, secuencias y/o construcciones descritas en el presente documento, pueden cruzarse con animales, tales como cerdos, que carecen de expresión de α -1,3-galactosiltransferasa (por ejemplo, como se describe en el documento WO 04/028243).

Los animales o células que carecen de expresión de inmunoglobulina funcional pueden contener modificaciones genéticas adicionales. La modificación genética adicional puede eliminar la expresión de un gen (fenotipo nulo -). La modificación genética adicional (fenotipo nulo +).

En el presente documento también se desvela un método para producir cerdos viables que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-GT funcional cruzando un cerdo macho heterocigótico para el gen de alfa-1,3-GT con un cerdo hembra heterocigótico para el gen de alfa-1,3-GT. Los cerdos pueden ser heterocigóticos debido a la modificación genética de un alelo del gen de alfa-1,3-GT para prevenir la expresión de ese alelo. Los cerdos pueden ser heterocigóticos debido a la presencia de una mutación puntual en un alelo del gen de alfa-1,3-GT. La mutación puntual puede ser una mutación puntual T a G en la segunda base del exón 9 del gen de alfa-1,3-GT. Se desvela un método para producir un animal porcino que carece de cualquier expresión de alfa-1,3-GT funcional, en el que un cerdo macho que contiene una mutación puntual T a G en la segunda base del exón 9 del gen de alfa-1,3-GT se cruza con un cerdo hembra que contiene una mutación puntual T a G en la segunda base del exón 9 del gen de alfa-1,3-GT, o viceversa.

Las modificaciones genéticas pueden incluir más de solo el direccionamiento homólogo, pero también pueden incluir integraciones aleatorias de genes exógenos, mutaciones, delecciones e inserciones de genes de cualquier tipo. Las modificaciones genéticas adicionales pueden hacerse modificando genéticamente adicionalmente células obtenidas de las células y animales transgénicos descritos en el presente documento o, en ciertos casos, cruzando los animales descritos en el presente documento con animales que se han modificado genéticamente adicionalmente.

Ejemplos no limitantes de modificaciones genéticas adicionales incluyen modificaciones para eliminar la expresión de al menos un alelo del gen de alfa-1,3-galactosiltransferasa, el gen de CMP-Neu5Ac hidroxilasa (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 7.368.284), el gen de iGb3 sintasa (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. N° 2005/0155095) y/o el gen de sintasa de Forssman (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. N° 2006/0068479). Puede eliminarse o reducirse la expresión de genes adicionales responsables de rechazo de xenoinjerto. Tales genes incluyen, pero no se limitan a, el gen de CMP-NEUAc hidroxilasa, el gen de isoglobósido 3 sintasa y el gen de sintasa de Forssman. Además, los genes o ADNc que codifica las proteínas relacionadas con el complemento, que son responsables de la supresión de la lisis mediada por el complemento, también pueden expresarse en los animales y tejidos desvelados en el presente documento. Tales genes incluyen, pero no se limitan a, CD59, DAF, MCP y CD46 (véase, por ejemplo, el documento WO 99/53042; Chen et al. Xenotransplantation, Volumen 6 Issue 3 Page 194-August 1999, que describe cerdos que expresan transgenes CD59/DAF; Costa C et al, Xenotransplantation. 2002 January; 9(1):45-57, que describe cerdos transgénicos que expresan CD59 humano y H-transferasa; Zhao L et al.; Diamond L E et al. Transplantation. 2001 Jan. 15; 71(1):132-42, que describe cerdos transgénicos para CD46 humano.

Ejemplos no limitantes de modificaciones genéticas adicionales incluyen modificaciones para expresar fucosiltransferasa, sialiltransferasa y/o cualquier miembro de la familia de las glucosiltransferasas.

Modificaciones adicionales pueden incluir expresión de compuestos, tales como anticuerpos, que regulan por disminución la expresión de una molécula de adhesión a células por las células, tal como se describe en el documento WO 00/31126, titulado "Suppression of xenograft rejection by down regulation of a cell adhesion molecules" y compuestos en los que se previene la co-estimulación por la señal 2, tales como por administración al

receptor del órgano de una forma soluble de CTLA-4 del organismo donante xenógeno, por ejemplo, como se describe en el documento WO 99/57266, titulado "Immunosuppression by blocking T cell costimulation signal 2 (B7/CD28 interaction)". La activación de linfocitos T requiere al menos dos conjuntos de eventos de señalización. El primero se inicia por el reconocimiento específico mediante el receptor de linfocitos T de un péptido antigénico combinado con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) sobre células presentadoras de antígeno (APC). El segundo conjunto de señales es no específico del antígeno y se administra por receptores co-estimulantes de linfocitos T que interaccionan con sus ligandos sobre APC. En ausencia de coestimulación, la activación de linfocitos T se altera o aborta, que puede producir un estado insensible específico de antígeno de anergia clonal, o delección por muerte apoptótica. De las varias vías co-estimulantes de linfocitos T, la más importante es la vía de CD28. CD28, una molécula de la superficie celular expresada sobre linfocitos T, y sus contrarreceptores, las moléculas B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86), presentes sobre células dendríticas, macrófagos y linfocitos B, se han caracterizado e identificado como dianas atractivas para interrumpir señales co-estimulantes de linfocitos T.

El antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA4), un antígeno de superficie de linfocitos T que está regulado por incremento tras la interacción con CD28/B7, comparte afinidad por los ligandos B7 con CD28, y puede en realidad unirse a CD80 y CD86 con mayor afinidad y avidéz que CD28. CTLA4 compite satisfactoriamente con CD28 en la unión a B7 sobre APC y, al hacer esto, regula por disminución la respuesta de linfocitos T. Este bloqueo co-estimulante por CTLA4 ofrece una estrategia para la regulación por disminución de la respuesta de linfocitos T CD4+. Se ha mostrado que CTLA4-Ig humano (hCTLA4-Ig) inhibe satisfactoriamente la proliferación de linfocitos T CD4+ bloqueando la activación de CD28/B7 coestimulante de todos los linfocitos T CD4+ *in vitro* e *in vivo* en ratones (Engelhardt et al., J Immunology, 177:1052-1061, 2006) y primates no humanos (Levisetti, et al., J Immunology, 159:5187-5191, 1997).

Los animales o células que carecen de expresión de inmunoglobulina funcional, producidos según la presente divulgación, pueden modificarse adicionalmente para expresar transgénicamente una proteína 4-inmunoglobina asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4), o estos animales que carecen de Ig funcional pueden cruzarse con animales que expresan transgénicamente CTLA4. Los animales o células pueden modificarse para expresar el péptido CTLA4 o un fragmento biológicamente activo (por ejemplo, dominio extracelular, forma truncada del péptido en el que al menos el dominio transmembrana se ha eliminado) o derivado del mismo. El péptido puede ser, por ejemplo, humano o porcino. El péptido CTLA4 puede estar mutado. Los péptidos mutados pueden tener mayor afinidad que los no mutantes para moléculas B7 porcinas y/o humanas. El CTLA4 mutado puede ser CTLA4 (Glu104, Tyr29). El péptido CTLA4 puede modificarse de forma que se exprese intracelularmente. Otras modificaciones del péptido CTLA4 incluyen la adición de una señal de retención del retículo endoplásmico al extremo N o C. La señal de retención del retículo endoplásmico puede ser, por ejemplo, la secuencia KDEL. El péptido CTLA4 puede fusionarse con un dominio de dimerización de péptido o una molécula de inmunoglobulina (Ig). Los péptidos de fusión de CTLA4 pueden incluir una secuencia conectora que pueden unir los dos péptidos. Los animales que carecen de expresión de inmunoglobulina funcional, producidos según la presente divulgación, pueden administrarse con un péptido CTLA4 (pCTLA4-Ig, o hCTLA4-Ig (Orencia)) como fármaco para suprimir su respuesta de linfocitos T.

Para lograr estas modificaciones genéticas adicionales, las células pueden modificarse para contener múltiples modificaciones genéticas. Alternativamente, los animales pueden cruzarse juntos para lograr múltiples modificaciones genéticas. Los animales, tales como cerdos, que carecen de expresión de inmunoglobulina funcional, producidos según el proceso, secuencias y/o construcciones descritas en el presente documento, pueden cruzarse con animales, tales como cerdos, que carecen de expresión de alfa-1,3-galactosil transferasa (por ejemplo, como se describe en el documento WO 04/028243).

Expresión de inmunoglobulina xenógena

En el presente documento se desvelan animales y células que carecen de expresión de inmunoglobulina nativa y se modifican adicionalmente para expresar al menos parte de un locus de anticuerpo xenógeno, y en particular humano, (es decir, inmunoglobulina (Ig)). Este locus humano puede someterse a reordenamiento y expresar una diversa población de moléculas de anticuerpo humano en el ungulado. Estos ungulados transgénicos clonados proporcionan un suministro teóricamente infinito reponible de anticuerpos humanos (tales como anticuerpos policlonales), que pueden usarse para fines terapéuticos, de diagnóstico, purificación, y otros fines clínicamente relevantes.

Puede usarse cromosoma artificial (AC) para realizar la transferencia de genes de inmunoglobulina humana en células de ungulado y animales. Los AC permiten la integración dirigida de fragmentos de ADN de tamaño de megabases que contienen genes únicos o múltiples genes. Los AC, por tanto, pueden introducir ADN heterólogo en células seleccionadas para la producción del producto génico codificado por el ADN heterólogo. Pueden usarse uno o más AC con ADN de inmunoglobulina humana integrado como vector para la introducción de genes de Ig humana en ungulados (tales como cerdos). Construidos por primera vez en levadura en 1983, los AC son moléculas de ADN lineal hechas por el hombre construidas a partir de elementos de secuencia de ADN que actúan en *cis* esenciales que son responsables de la apropiada replicación y reparto de cromosomas naturales (Murray et al. (1983), Nature

301:189-193). Un cromosoma requiere al menos tres elementos para funcionar. Específicamente, los elementos de un cromosoma artificial incluyen al menos: (1) secuencias de replicación autónoma (ARS) (que tienen propiedades de orígenes de replicación—que son los sitios para el inicio de la replicación de ADN), (2) centrómeros (sitio de ensamblaje de los cinetocoros que es el responsable de la apropiada distribución de cromosomas replicados en la mitosis y meiosis), y (3) telómeros (estructuras especializadas en los extremos de cromosomas lineales que funcionan tanto estabilizando los extremos como facilitando la completa replicación de los extremos de la molécula de ADN).

La Ig humana puede mantenerse como una unidad independiente (un episoma) separada del ADN cromosómico de ungulado. Por ejemplo, vectores episómicos contienen los elementos de la secuencia de ADN necesarios requeridos para la replicación de ADN y el mantenimiento del vector dentro de la célula. Están disponibles comercialmente vectores episómicos (véase, por ejemplo, Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (1982) pp. 368-369). El AC puede replicarse establemente y segregarse junto a los cromosomas endógenos. Pueden integrarse secuencias de ADN de IgG humana en los cromosomas de las células de ungulados, permitiendo así que se replique y se reparta la nueva información a la progenie de células como parte de los cromosomas naturales (véase, por ejemplo, Wigler et al. (1977), *Cell* 11:223). El AC puede translocarse a, o insertarse en, el cromosoma endógeno de la célula de ungulado. Dos o más AC pueden introducirse en la célula huésped simultáneamente o secuencialmente.

Los AC, además, puede proporcionar un locus extra-genómico para la integración dirigida de fragmentos de ADN de tamaño de megabases que contienen genes individuales o múltiples genes, que incluyen múltiples copias de un único gen operativamente ligado a un promotor o cada copia o varias copias ligadas para separar promotores. Los AC pueden permitir la integración dirigida de fragmentos de ADN de tamaño de megabases que contienen genes individuales o múltiples genes de inmunoglobulina humana. Los AC pueden generarse cultivando las células con cromosomas dicéntricos (es decir, cromosomas con dos centrómeros) bajo tales condiciones conocidas para un experto en la materia por las cuales el cromosoma se rompe para formar un minicromosoma y cromosoma anteriormente dicéntrico.

Los AC pueden construirse a partir de seres humanos (cromosomas artificiales humanos: "HAC"), levadura (cromosomas artificiales de levadura: "YAC"), bacterias (cromosomas artificiales bacterianos: "BAC"), bacteriófago (cromosomas artificiales derivados de P1: "PAC") y otros mamíferos (cromosomas artificiales de mamífero: "MAC"). Los AC obtienen su nombre (por ejemplo, YAC, BAC, PAC, MAC, HAC) basándose en el origen del centrómero. Un YAC, por ejemplo, puede obtener su centrómero de *S. cerevisiae*. Los MAC, por otra parte, incluyen un centrómero de mamífero activo, mientras que los HAC se refieren a cromosomas que incluyen centrómeros humanos. Además, también pueden construirse cromosomas artificiales de planta ("PLAC") y cromosomas artificiales de insecto. Los AC pueden incluir elementos derivados de cromosomas que son responsables de tanto la replicación como el mantenimiento. Los AC, por tanto, pueden mantener establemente grandes fragmentos de ADN genómico tal como ADN de Ig humana.

Se desvelan en el presente documento ungulados que contienen YAC. Los YAC son cromosomas circulares genéticamente manipulados que contienen elementos de cromosomas de levadura, tales como *S. cerevisiae*, y segmentos de ADN extraños que pueden ser mucho mayores que aquellos aceptados por vectores de clonación convencionales (por ejemplo, plásmidos, cósmidos). Los YAC permiten la propagación de segmentos muy grandes de ADN exógeno (Schlessinger, D. (1990), *Trends in Genetics* 6:248-253) en células de mamífero y animales (Choi et al. (1993), *Nature Gen* 4:117-123). Los enfoques transgénicos de YAC son muy poderosos y están enormemente potenciados por la capacidad para manipular eficazmente el ADN clonado. Una ventaja técnica importante de la levadura es la facilidad con la que pueden prepararse modificaciones del genoma específicas mediante transformación mediada por ADN y recombinación homóloga (Ramsay, M. (1994), *Mol Biotech* 1:181-201). Pueden usarse uno o más YAC con ADN de Ig humana integrado como vector para la introducción de genes de Ig humana en ungulados (tales como cerdos).

Los vectores de YAC contienen componentes estructurales específicos para la replicación en levadura, que incluyen: un centrómero, telómeros, secuencia de replicación autónoma (ARS), marcadores de selección de levadura (por ejemplo, TRP1, URA3 y SUP4) y un sitio de clonación para la inserción de segmentos grandes de más de 50 kb de ADN exógeno. Los genes marcadores pueden permitir la selección de las células que llevan el YAC y sirven de sitios para la síntesis de endonucleasas de restricción específicas. Por ejemplo, los genes TRP1 y URA3 pueden usarse como marcadores de selección dobles para garantizar que solo se mantienen cromosomas artificiales completos. Marcadores de selección de levadura pueden ser llevados sobre ambos lados del centrómero, y se separan dos secuencias que siembran la formación de telómeros *in vivo*. Solo una fracción de un porcentaje de una célula de ADN total de levadura es necesaria para la replicación, sin embargo, incluyendo el centro del cromosoma (el centrómero, que sirve del sitio de unión entre cromátidas hermanas y los sitios de unión de las fibras del huso durante la mitosis), los extremos del cromosoma (telómeros, que sirven de secuencias necesarias para mantener los extremos de cromosomas eucariotas) y otro estiramiento corto de ADN llamado la ARS que sirve de segmentos de ADN en los que la doble hélice puede desenrollarse y empezar a copiarse a sí misma. Los YAC pueden usarse para clonar hasta aproximadamente 1, 2 o 3 Mb de ADN de inmunoglobulina, o al menos 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 kilobases.

También pueden usarse plásmidos integrantes de levadura, vectores replicantes (que son fragmentos de YAC), para expresar Ig humana. El plásmido integrante de levadura puede contener secuencias de plásmido bacteriano que proporcionan un origen de replicación y un gen de resistencia a fármaco para el crecimiento en bacterias (por ejemplo, *E. coli*), un gen marcador de levadura para la selección de transformantes en levadura, y sitios de restricción para insertar secuencias de Ig. Las células huésped pueden adquirir establemente este plásmido integrándolo directamente en un cromosoma. También pueden usarse vectores de replicación de levadura para expresar Ig humana como círculos de plásmido libre en levadura. Los vectores que contienen levadura o ARS pueden estabilizarse mediante la adición de una secuencia de centrómero. Los YAC tienen tanto regiones centrómeras como telómeras, y pueden usarse para clonar trozos muy grandes de ADN debido a que el recombinante se mantiene esencialmente como cromosoma de levadura. Se desvelan YAC en el presente documento, por ejemplo, como se desvela en las patentes de EE.UU. N° 6.692.954, 6.495.318, 6.391.642, 6.287.853, 6.221.588, 6.166.288, 6.096.878, 6.015.708, 5.981.175, 5.939.255, 5.843.671, 5.783.385, 5.776.745, 5.578.461 y 4.889.806; patentes europeas N° 1 356 062 y 0 648 265; publicaciones PCT N° WO 03/025222, WO 02/057437, WO 02/101044, WO 02/057437, WO 98/36082, WO 98/12335, WO 98/01573, WO 96/01276, WO 95/14769, WO 95/05847, WO 94/23049 y WO 94/00569.

También se desvelan ungulados que contienen BAC. Los BAC son plásmidos basados en F encontrados en bacterias, tales como *E. coli*, que pueden transferir aproximadamente 300 kb de ADN extraño a una célula huésped. Una vez el ADN de Ig se ha clonado en la célula huésped, el segmento recientemente insertado puede replicarse junto con el resto del plásmido. Como resultado, pueden prepararse billones de copias de ADN extraño en un tiempo muy corto. Pueden usarse uno o más BAC con ADN de Ig humana integrado como vector para la introducción de genes de Ig humana en ungulados (tales como cerdos).

El sistema de clonación de BAC se basa en el factor F de *E. coli*, cuya replicación está estrictamente controlada y así garantiza el mantenimiento estable de grandes construcciones (Willets, N., y R. Skurray (1987), Structure and function of the F-factor and mechanism of conjugation. In *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: Cellular and Molecular Biology (F. C. Neidhardt, Ed) Vol. 2 pp 1110-1133, Am. Soc. Microbiol., Washington, D.C.). Se han usado BAC ampliamente para clonar ADN de diversas especies eucariotas (Cai et al. (1995), Genomics 29:413-425; Kim et al. (1996), Genomics 34:213-218; Misumi et al. (1997), Genomics 40:147-150; Woo et al. (1994), Nucleic Acids Res 22:4922-4931; Zimmer, R. y Gibbins, A.M.V. (1997), Genomics 42:217-226). La baja manifestación del plásmido F puede reducir las posibilidades de recombinación entre fragmentos de ADN y puede evitar la expresión en exceso letal de genes bacterianos clonados. Los BAC pueden mantener establemente los genes de inmunoglobulina humana en un vector de una única copia en las células huésped, incluso después de 100 o más generaciones de crecimiento en serie. Los vectores de BAC (o pBAC) pueden acomodar insertos en el intervalo de aproximadamente 30 a 300 pares de kb. Un tipo específico de vector de BAC, pBeloBac11, usa una complementación del gen lacZ para distinguir moléculas recombinantes que contienen inserto de colonias que llevan el vector de BAC, por color. Cuando un fragmento de ADN se clona en el gen lacZ de pBeloBac11, la activación insercional produce una colonia blanca sobre placas de X-Gal/IPTG después de la transformación (Kim et al. (1996), Genomics 34:213-218) para identificar fácilmente clones positivos. Por ejemplo, pueden proporcionarse BAC tal como se desvela en las patentes de EE.UU. N° 6.713.281, 6.703.198, 6.649.347, 6.638.722, 6.586.184, 6.573.090, 6.548.256, 6.534.262, 6.492.577, 6.492.506, 6.485.912, 6.472.177, 6.455.254, 6.383.756, 6.277.621, 6.183.957, 6.156.574, 6.127.171, 5.874.259, 5.707.811 y 5.597.694; patente europea N° 0 805 851; publicaciones PCT N° WO 03/087330, WO 02/00916, WO 01/39797, WO 01/04302, WO 00/79001, WO 99/54487, WO 99/27118 y WO 96/21725.

También se desvelan ungulados que contienen PAC de bacteriófago. Pueden usarse uno o más PAC de bacteriófago con ADN de Ig humana integrado como vector para la introducción de genes de Ig humana en ungulados (tales como cerdos). Por ejemplo, pueden proporcionarse PAC tal como se desvela en las patentes de EE.UU. N° 6.743.906, 6.730.500, 6.689.606, 6.673.909, 6.642.207, 6.632.934, 6.573.090, 6.544.768, 6.489.458, 6.485.912, 6.469.144, 6.462.176, 6.413.776, 6.399.312, 6.340.595, 6.287.854, 6.284.882, 6.277.621, 6.271.008, 6.187.533, 6.156.574, 6.153.740, 6.143.949, 6.017.755, y 5.973.133; patente europea N° 0 814 156; publicaciones PCT N° WO 03/091426, WO 03/076573, WO 03/020898, WO 02/101022, WO 02/070696, WO 02/061073, WO 02/31202, WO 01/44486, WO 01/07478, WO 01/05962 y WO 99/63103.

También se desvelan ungulados que contienen MAC. Los MAC poseen alta estabilidad mitótica, expresión génica coherente y regulada, alta capacidad de clonación y no inmunogenicidad. Los cromosomas de mamífero pueden comprender una hebra lineal continua de ADN que oscila en tamaño de aproximadamente 50 a 250 Mb. La construcción de ADN puede contener adicionalmente una o más secuencias necesarias para la construcción de ADN para multiplicarse en células de levadura. La construcción de ADN también puede contener una secuencia que codifica un gen marcador de selección. La construcción de ADN puede ser capaz de ser mantenida como un cromosoma en una célula transformada con la construcción de ADN. Los MAC proporcionan sitios de integración específica extra-genómicos para la introducción de genes que codifican proteínas de interés y permiten la integración de ADN de tamaño de megabases de manera que, por ejemplo, los genes que codifican una vía metabólica entera, un gen muy grande [por ejemplo, tal como el gen de la fibrosis quística (CF) (-600 kb)], o varios genes [por ejemplo, una serie de antígenos para la preparación de una vacuna multivalente], puedan introducirse establemente en una célula.

También se desvelan métodos usando los MAC para construir cromosomas artificiales de otras especies, tales como especies de insecto y de pez. Los cromosomas artificiales son cromosomas estables completamente funcionales. Se desvelan dos tipos de cromosomas artificiales. Un tipo, denominado en el presente documento SATAC [cromosomas artificiales satélite], son cromosomas heterocromáticos estables, y el otro tipo son minicromosomas basándose en la

amplificación de eucromatina. Como se usa en el presente documento, un cromosoma anteriormente dicéntrico es un cromosoma que se produce cuando un cromosoma dicéntrico se fragmenta y adquiere nuevos telómeros de manera que se producen dos cromosomas, que tiene cada uno uno de los centrómeros. Cada uno de los fragmentos pueden ser cromosomas replicables.

Pueden generarse cromosomas artificiales cultivando las células con los cromosomas dicéntricos en condiciones por las cuales el cromosoma se rompe para formar un minicromosoma y cromosoma anteriormente dicéntrico. Pueden generarse SATAC a partir del fragmento de minicromosoma, véase, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 5.288.625. Alternativamente, pueden generarse SATAC a partir del fragmento del cromosoma anteriormente dicéntrico. Pueden prepararse SATAC de unidades de repetición de ADN satélite corto y pueden ser completamente heterocromáticos. En ausencia de inserción de ADN heterólogo o extraño, el SATAC no puede contener información genética. Se desvelan SATAC de diversos tamaños que se forman por cultivo repetido bajo condiciones selectivas y subclonando células que contienen cromosomas producidos a partir de los cromosomas anteriormente dicéntricos. Estos cromosomas pueden basarse en unidades de repetición de 7,5 a 10 Mb de tamaño, o mega-replicones. Estos mega-replicones pueden ser bloques aleatorios de ADN satélite flanqueado por ADN no satélite heterólogo. La amplificación puede producir una matriz aleatoria de segmentos de cromosomas idénticos [cada uno llamado un amplicón] que contiene dos mega-replicones invertidos limitados por ADN heterólogo ["extraño"]. La repetida fusión de células, crecimiento sobre medio selectivo y/o tratamiento con BrdU [5-bromodesoxiuridina] u otro reactivo o agente desestabilizante del genoma, tal como radiación ionizante, que incluye rayos X, y la subclonación puede producir líneas celulares que llevan cromosomas heterocromáticos o parcialmente heterocromáticos estables, que incluyen un cromosoma en "salchicha" de 150-200 Mb, un gigacromosoma de 500-1000 Mb, un megacromosoma de 250-400 Mb estable y diversos cromosomas estables más pequeños derivados de los mismos. Estos cromosomas se basan en estas unidades de repetición y pueden incluir ADN de inmunoglobulina humana que se expresa (véase también la patente de EE.UU. N° 6.743.967).

Pueden producirse MAC, por ejemplo, como se desvela en las patentes de EE.UU. n° 6.743.967, 6.682.729, 6.569.643, 6.558.902, 6.548.287, 6.410.722, 6.348.353, 6.297.029, 6.265.211, 6.207.648, 6.150.170, 6.150.160, 6.133.503, 6.077.697, 6.025.155, 5.997.881, 5.985.846, 5.981.225, 5.877.159, 5.851.760 y 5.721.118; publicaciones PCT N° WO 04/066945, WO 04/044129, WO 04/035729, WO 04/033668, WO 04/027075, WO 04/016791, WO 04/009788, WO 04/007750, WO 03/083054, WO 03/068910, WO 03/068909, WO 03/064613, WO 03/052050, WO 03/027315, WO 03/023029, WO 03/012126, WO 03/006610, WO 03/000921, WO 02/103032, WO 02/097059, WO 02/096923, WO 02/095003, WO 02/092615, WO 02/081710, WO 02/059330, WO 02/059296, WO 00/18941, WO 97/16533 y WO 96/40965.

También se desvelan ungulados y células de ungulado que contienen HAC. Pueden usarse uno o más HAC con ADN de Ig humana integrado como vector para la introducción de genes de Ig humana en ungulados (tales como cerdos). Se usan uno o más HAC con ADN de Ig humana integrado para generar ungulados (por ejemplo, cerdos) por transferencia nuclear expresando Ig humanas en respuesta a inmunización y que se someten a maduración por afinidad. Pueden usarse diversos enfoques para producir ungulados que expresan anticuerpos humanos ("Ig humana"). Estos enfoques incluyen, por ejemplo, la inserción de un HAC que contiene tanto genes de Ig de la cadena pesada como la ligera en un ungulado o la inserción de linfocitos B humanos o precursores de linfocitos B en un ungulado durante su etapa fetal o después de nacer (por ejemplo, un ungulado inmunodeficiente o inmunosuprimido) (véanse, por ejemplo, el documento WO 01/35735, presentada el 17 de noviembre de 2000, documentos US 02/08645, presentado el 20 de marzo de 2002). En cualquier caso, tanto las células productoras de anticuerpos humanos como los linfocitos B productores de anticuerpos de ungulado pueden estar presentes en el ungulado. En un ungulado que contiene a HAC, un único linfocito B puede producir un anticuerpo que contiene una combinación de proteínas de la cadena pesada y ligera de ungulado y humanas. El tamaño total del HAC puede ser al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 Mb. Por ejemplo, pueden proporcionarse HAC tal como se desvela en las patentes de EE.UU. n° 6.642.207, 6.590.089, 6.566.066, 6.524.799, 6.500.642, 6.485.910, 6.475.752, 6.458.561, 6.455.026, 6.448.041, 6.410.722, 6.358.523, 6.277.621, 6.265.211, 6.146.827, 6.143.566, 6.077.697, 6.025.155, 6.020.142 y 5.972.649; solicitud de patente de EE.UU. N° 2003/0037347; publicaciones PCT N° WO 04/050704, WO 04/044156, WO 04/031385, WO 04/016791, WO 03/101396, WO 03/097812, WO 03/093469, WO 03/091426, WO 03/057923, WO 03/057849, WO 03/027638, WO 03/020898, WO 02/092812 y WO 98/27200.

Ejemplos adicionales de AC en los que pueden insertarse secuencias de inmunoglobulina humana para su uso en la divulgación incluyen, por ejemplo, BAC (por ejemplo, pBeloBAC11 o pBAC108L; véanse, por ejemplo, Shizuya et al. (1992), Proc Natl Acad Sci USA 89(18):8794-8797; Wang et al. (1997), Biotechniques 23(6):992-994), PAC de bacteriófago, YAC (véase, por ejemplo, Burke (1990), Genet Anal Tech Appl 7(5):94-99) y MAC (véanse, por ejemplo, Vos (1997), Nat. Biotechnol. 15(12):1257-1259; Ascenzioni et al. (1997), Cancer Lett 118(2):135-142), tales como HAC, véanse, por tanto, las patentes de EE.UU. N° 6.743.967, 6.716.608, 6.692.954, 6.670.154, 6.642.207, 6.638.722, 6.573.090, 6.492.506, 6.348.353, 6.287.853, 6.277.621, 6.183.957, 6.156.953, 6.133.503, 6.090.584, 6.077.697, 6.025.155, 6.015.708, 5.981.175, 5.874.259, 5.721.118 y 5.270.201; patentes europeas N° 1 437 400, 1

234 024, 1 356 062, 0 959 134, 1 056 878, 0 986 648, 0 648 265 y 0 338 266; publicaciones PCT N° WO 04/013299, WO 01/07478, WO 00/06715, WO 99/43842, WO 99/27118, WO 98/55637, WO 94/00569 y WO 89/09219. Ejemplos adicionales incluyen aquellos AC proporcionados en, por ejemplo, las publicaciones PCT N° WO 02/076508, WO 03/093469, WO 02/097059; WO 02/096923; publicaciones de EE.UU. N° US 2003/0113917 y US 2003/003435; y la patente de EE.UU. n° 6.025.155.

Los AC pueden transmitirse mediante gametogénesis masculina en cada generación. El AC puede ser integrante o no integrante. El AC puede transmitirse mediante mitosis en sustancialmente todas las células en división. El AC puede proporcionar expresión independiente de la posición de una secuencia de ácidos nucleicos de inmunoglobulina humana. El AC puede tener una eficiencia de transmisión de al menos el 10 % a través de cada gametogénesis masculina y femenina. El AC puede ser circular. El AC no integrante puede ser aquel depositado en las Colecciones coordinadas belgas de microorganismos--BCCM el 27 de marzo de 2000 bajo el número de acceso LMBP 5473 CB. Se desvelan métodos para producir un AC en los que se identifica una unidad mitóticamente estable que contiene un ácido nucleico exógeno transmitido mediante gametogénesis masculina; y un sitio de entrada en la unidad mitóticamente estable permite la integración de genes de inmunoglobulina humana en la unidad.

Se desvelan AC que incluyen: un centrómero funcional, un marcador de selección y/o un sitio de clonación único. El AC puede presentar una o más de las siguientes propiedades: puede segregarse establemente como un cromosoma independiente, pueden insertarse secuencias de inmunoglobulina de una forma controlada y pueden expresarse a partir del AC, pueden transmitirse eficazmente a través de la línea germinal masculina y femenina y/o los animales transgénicos pueden llevar el cromosoma en más de aproximadamente el 30, 40, 50, 60, 70, 80 o el 90 % de sus células.

El AC puede aislarse de fibroblastos (tal como cualquier fibroblasto de mamífero o humano) en el que era mitóticamente estable. Después de transferir el AC en células de hámster, puede insertarse un sitio lox (tal como loxP) y un sitio de marcador de selección. El AC puede mantener la estabilidad mitótica, por ejemplo, mostrando una pérdida inferior a aproximadamente el 5, 2, 1, 0,5 o el 0,25 por ciento por mitosis en ausencia de selección. Véanse, por tanto, los documentos US 2003/0064509 y WO 01/77357.

Se desvelan ungulados transgénicos en el presente documento que expresan loci de inmunoglobulina xenógena o fragmento de los mismos. La inmunoglobulina xenógena puede expresarse a partir de un locus de inmunoglobulina que se integra dentro de un cromosoma de ungulado endógeno. Alternativamente, la inmunoglobulina xenógena puede no integrarse con un cromosoma endógeno. También se desvelan células de ungulado derivadas de los animales transgénicos. El locus de inmunoglobulina xenógena puede ser heredado por la descendencia. Alternativamente, el locus de inmunoglobulina xenógena puede ser heredado a través de la línea germinal masculina por la descendencia. Un cromosoma artificial (AC) puede contener la inmunoglobulina xenógena. El AC puede ser un AC de levadura o un AC de mamífero. El locus xenógeno pueden ser un locus de inmunoglobulina humana o fragmento del mismo. El locus de inmunoglobulina humana puede ser el cromosoma 14 humano, cromosoma 2 humano y el cromosoma 22 humano, o fragmentos de los mismos. El locus de inmunoglobulina humana puede incluir cualquier fragmento de una inmunoglobulina humana que pueda someterse a reordenamiento. Los loci de inmunoglobulina humana pueden incluir cualquier fragmento de una cadena pesada de inmunoglobulina humana y una cadena ligera de inmunoglobulina humana que puedan someterse a reordenamiento. Los loci de inmunoglobulina humana pueden incluir cualquier locus de inmunoglobulina humana o fragmento del mismo que pueda producir un anticuerpo tras la exposición a un antígeno. La inmunoglobulina humana exógena puede expresarse en linfocitos B para producir inmunoglobulina xenógena en respuesta a exposición a uno o más antígenos.

Pueden insertarse genes de inmunoglobulina humana, tales como el gen de la cadena pesada de Ig (cromosoma 14 humano), gen de la cadena kappa de Ig (cromosoma humano n° 2) y/o el gen de la cadena lambda de Ig (cromosoma n° 22) en AC, como se ha descrito anteriormente. Cualquier porción de los genes de Ig pesado, kappa y/o lambda humanos pueden insertarse en AC. El ácido nucleico puede ser al menos el 70, 80, 90, 95 o el 99 % idéntico a la región correspondiente de un ácido nucleico que se produce naturalmente de un ser humano. Más de una clase de anticuerpo humano puede producirse por el ungulado. Más de una Ig humana diferente o anticuerpo puede producirse por el ungulado. Puede introducirse un AC que contiene tanto un gen de la cadena pesada de Ig humana como gen de la cadena ligera de Ig, tal como un cromosoma artificial humano automático ("AHAC," una molécula circular de ácido nucleico recombinante que se convierte en un cromosoma humano lineal *in vivo* por una endonucleasa de restricción endógenamente expresada). Los loci de la cadena pesada humana y los loci de la cadena ligera pueden estar sobre diferentes brazos del cromosoma (es decir, sobre un lado diferente del centrómero). La cadena pesada puede incluir la cadena pesada mu, y la cadena ligera puede ser una cadena ligera lambda o kappa. Los genes de Ig pueden introducirse simultáneamente o secuencialmente en uno o más de un AC.

El ungulado o célula de ungulado puede expresar uno o más ácidos nucleicos que codifican toda o parte de un gen de Ig humana que se somete a reordenamiento y expresa más de una molécula de Ig humana, tal como una proteína de anticuerpo humano. Así, el ácido nucleico que codifica la cadena de Ig humana o anticuerpo está en su forma sin reordenar (es decir, el ácido nucleico que no se ha sometido a recombinación V(D)J). Todos los segmentos de ácidos nucleicos que codifican un segmento génico V de una cadena ligera del anticuerpo pueden

- separarse de todos los segmentos de ácidos nucleicos que codifican un segmento génico J por uno o más nucleótidos. Todos los segmentos de ácidos nucleicos que codifican un segmento génico V de una cadena pesada del anticuerpo pueden separarse de todos los segmentos de ácidos nucleicos que codifican un segmento génico D por uno o más nucleótidos, y/o todos los segmentos de ácidos nucleicos que codifican un segmento génico D de una cadena pesada del anticuerpo se separan de todos los segmentos de ácidos nucleicos que codifican un segmento génico J por uno o más nucleótidos. La administración de un antígeno a un ungulado transgénico que contiene un gen de Ig humana sin reordenar va seguida del reordenamiento de segmentos de ácidos nucleicos en el locus del gen de Ig humana y la producción de anticuerpos humanos reactivos con el antígeno.
- El AC puede expresar una porción o fragmento de un cromosoma humano que contiene un gen de inmunoglobulina. El AC puede expresar al menos 300 o 1300 kb del locus de la cadena ligera humana, tal como se describe en Davies et al. 1993 Biotechnology 11:911-914.
- La genes de inmunoglobulina humana pueden insertarse primero en AC y a continuación los AC que contienen la inmunoglobulina humana pueden insertarse en las células de ungulado. Alternativamente, los AC pueden transferirse a una célula de mamífero intermedia, tal como una célula CHO, antes de la inserción en la célula de ungulado. La célula de mamífero intermedia también puede contener y AC y el primer AC puede insertarse en el AC de la célula de mamífero. En particular, un YAC que contiene genes de inmunoglobulina humana o fragmentos de la misma en una célula de levadura puede transferirse a una célula de mamífero que aloja un MAC. El YAC puede insertarse en el MAC. El MAC puede entonces transferirse a una célula de ungulado. Los genes de Ig humana pueden insertarse en AC por recombinación homóloga. El AC resultante que contiene genes de Ig humana puede entonces introducirse en células de ungulado. Pueden seleccionarse una o más células de ungulado por técnicas descritas en el presente documento o aquellas conocidas en la técnica, que contienen un AC que contiene una Ig humana.
- La transferencia de AC que contienen genes de inmunoglobulina humana a células porcinas, tales como aquellas descritas en el presente documento o conocidas en la técnica, puede llevarse a cabo mediante transferencia mediada por recombinasa específica de sitio. Los AC pueden transferirse en células de fibroblastos porcinos. Los AC pueden ser YAC. El ADN circularizado, tal como un AC, que contiene el sitio diana de recombinasa específica de sitio puede transferirse en una línea celular que tiene un sitio diana de recombinasa específica de sitio dentro de su genoma. El sitio diana de recombinasa específica de sitio de la célula puede localizarse dentro de un cromosoma exógeno. El cromosoma exógeno puede ser un cromosoma artificial que no se integra en el genoma endógeno del huésped. El AC puede transferirse mediante transmisión de la línea germinal a la descendencia. Un YAC que contiene un gen de inmunoglobulina humana o fragmento del mismo puede circularizarse mediante una recombinasa específica de sitio y a continuación transferirse en una célula huésped que contiene un MAC, en el que el MAC contiene un sitio de recombinasa específica de sitio. Este MAC que ahora contiene loci de inmunoglobulina humana o fragmentos de los mismos puede entonces fusionarse con una célula porcina, tal como, pero no se limita a, un fibroblasto. La célula porcina puede entonces usarse para transferencia nuclear.
- Se desvelan métodos para circularizar al menos 100 kb de ADN en los que el ADN puede entonces integrarse en un genoma de huésped mediante una recombinasa específica de sitio. Pueden circularizarse al menos 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000, 5000, 10.000 kb de ADN. Alternativamente, pueden circularizarse al menos 1000, 2000, 5000, 10.000 o 20.000 megabases de ADN. La circularización del ADN puede llevarse a cabo uniéndose sitios diana de recombinasa específica de sitio en cada extremo de la secuencia de ADN y luego aplicando la recombinasa específica de sitio para producir circularización del ADN. El sitio diana de recombinasa específica de sitio puede ser lox. El sitio diana de recombinasa específica de sitio puede ser Flt. El ADN puede ser un cromosoma artificial, tal como un YAC o cualquier AC descrito en el presente documento o conocido en la técnica. El AC puede contener loci de inmunoglobulina humana o fragmentos de los mismos.
- Recombinasas específicas de sitio incluyen enzimas o recombinasas que reconocen y se unen a un sitio de ácido nucleico corto o sitio diana de recombinasa específica de secuencia, es decir, un sitio de reconocimiento de recombinasa, y catalizan la recombinación de ácido nucleico en relación con estos sitios. Estas enzimas incluyen recombinasas, transposasas e integrasas. Ejemplos de sitio diana de recombinasa específica de secuencia incluyen, pero no se limitan a, sitios lox, sitios att, sitios dif y sitios frt. Ejemplos no limitantes de recombinasas específicas de sitio incluyen, pero no se limitan a, recombinasa Cre del bacteriófago P1, recombinasa de levadura FLP, integrasa Int1, bacteriófago lambda, recombinasa phi 80, P22, P2, 186 y P4, resolvasa Tn3, la recombinasa Hin, y la recombinasa Cin, recombinasas xerC y xerD de *E. coli*, recombinasa de *Bacillus thuringiensis*, TpnI y los transposones de β -lactamasa, y las recombinasas de inmunoglobulina. El sitio de recombinación puede ser un sitio lox que es reconocido por la recombinasa Cre del bacteriófago P1. Los sitios lox se refieren a una secuencia de nucleótidos en la que el producto del gen cre del bacteriófago P1, la recombinasa Cre, puede catalizar un evento de recombinación específico de sitio. Se conocen en la técnica una variedad de sitios lox, que incluyen loxP, loxB, loxL y loxR que se producen naturalmente, además de varios sitios lox mutantes, o de variante, tales como loxP511, loxP514, loxdelta86, loxdelta117, loxC2, loxP2, loxP3 y lox P23. Ejemplo adicional de sitios lox incluyen, pero no se limitan a, loxB, loxL, loxR, loxP, loxP3, loxP23, lo-delta-86, lox-delta- 117, loxP511 y loxC2. El sitio de recombinación puede ser un sitio de recombinación que es reconocido por una recombinasa distinta de Cre. El sitio de recombinasa puede ser los sitios FRT reconocidos por la recombinasa FLP del plásmido 2 pi de *Saccharomyces cerevisiae*. Sitios

FRT se refieren a una secuencia de nucleótidos en la que el producto del gen FLP del plásmido de 2 micrómetros de levadura, FLP recombinasa, puede catalizar la recombinación específica de sitio. Ejemplos adicionales de las recombinasas no Cre incluyen, pero no se limitan a, recombinasas específicas de sitio que incluyen: sitios att reconocidos por la recombinasa Int del bacteriófago lambda (por ejemplo, att1, att2, att3, attP, attB, attL y attR), los sitios de recombinación reconocidos por la familia de la resolvasa y el sitio de recombinación reconocido por transposasa de *Bacillus thuringiensis*.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Construcción y diseño del vector Hc KO.

Se clonó y caracterizó una porción del locus Hc de Ig porcina genómico. La Figura 1 ilustra la arquitectura del locus de Hc porcino. Se encontró que JH funcional individual residía dentro de 6 kb en la dirección 5' de la secuencia codificante para Mu constante (región Cμ). JH porcino se identificó como un 'talón de Aquiles' que podría ser seleccionado para producir solo reordenamiento VDJ no funcional y, así, prevenir la supervivencia de linfocitos B.

Se construyó un vector que elige como diana trampa de poli (A) (pPL708, Figura 1) flanqueando un casete de potenciador del CMV-pgk-neoR que carecía de secuencia señal de poliA, con un brazo en la dirección 5' de 2 kb y un brazo en la dirección 3' de 5,8 kb de homología. El brazo en la dirección 3' retuvo JH completa para el intrón Cμ, y algunos pb de la secuencia JH de 3', para asegurar el corte y empalme normal entre el transcrito neoR y las señales de poli(A) encontradas en la dirección 3' de la región codificante de Cμ.

Construcción de vector. Los datos de la secuencia de Hc requeridos para la construcción de un vector que elige como diana el gen Hc porcino se generaron usando un cromosoma artificial bacteriano (BAC) que lleva una porción importante de Hc de Ig porcina (J.E. Butler, J. Sun y P. Chardon, sin publicar). Etapas posteriores implicaron la amplificación de secuencias de Hc porcinas relevantes de una línea celular de PPFF usando secuencias de cebador basadas en el análisis de secuencias de BAC (véase la Fig. 1). La línea celular de PPFF usada para generar el vector que elige diana fue la misma que la usada para SCNT. Se usó PCR de intervalo largo para generar un amplímero de 9,2 kb que incluyó la región JH junto con secuencias flanqueantes de Hc de Ig porcino. Se hizo de manera que ambos brazos homólogos del vector que elige diana pudieran generarse a partir de un fragmento contiguo. Un amplímero de 2,0 kb sirvió de brazo 5' del vector inactivado, con un sitio Sall en el extremo 5' introducido por PCR. Comprendió secuencias dentro del intrón entre las regiones DH y JH, además de 4 pseudo JH localizadas en la dirección 5' de JH funcional. Este fragmento se clonó en el plásmido TOPO XL (Invitrogen, Carlsbad, CA). Un amplímero de 5,9 kb sirvió de brazo homólogo 3' del vector inactivado. Comprendió el extremo 3' de la región codificante JH funcional (la quinta JH) y se extiende más allá de la señal de poliA de la región codificante Cμ?1. Este fragmento se clonó entonces en TOPO XL. El vector pKOTKneo (Lexicon Genetics, The Woodlands, TX) del que se había escindido la señal de poliA se usó para generar la construcción que elige como diana pPL708. Un fragmento Xba1/BamH1 que contiene la secuencia del brazo homólogo 3' de 5,8 kb se ligó en el vector pKOTKneo digerido con Xba1/BglII, en la dirección 3' del casete de promotor de PGK-gen de resistencia a neomicina (pgk-neoR). Un fragmento Sal1/BamH1 que contiene la secuencia del brazo homólogo 5' de 2,0 kb se ligó en este mismo vector digerido con Sal1/BamH1, en la dirección 5' del casete de PGK-gen neoR. Se insertó una secuencia potenciadora del CMV de 0,4 kb en el sitio BamH1 de este vector, entre el brazo homólogo de 5' y el casete de PGK-neoR, preparando un casete de CMV-PGK-neoR para completar el vector que elige como diana Hc de pPL708. Se obtuvieron reactivos de PCR de Takara, Japón, y las enzimas de restricción de NEB, Ipswich, MA.

Ejemplo 2: Hc KO heterocigótico en células porcinas.

Aislamiento y transfección de fibroblastos fetales porcinos primarios. Se aislaron células de PPFF PCFF4-1 a PCFF4-10 de 10 fetos del mismo embarazo en el día 33 de gestación. Después de extraer la cabeza y las vísceras, los fetos se lavaron con solución salina equilibrada con Hanks (HBSS, Invitrogen), se dispusieron en 20 ml de HBSS y se hicieron dados con unas tijeras quirúrgicas pequeñas. El sedimento de tejido se resuspendió en tubos de 50 ml con 40 ml de DMEM + 100 U/ml de colagenasa (Invitrogen) por feto. Los tubos se incubaron durante 40 min en un baño de agua con agitación a 37 °C. El tejido digerido se dejó sedimentar durante 3-4 min y el sobrenadante enriquecido en células se transfirió a un nuevo tubo de 50 ml y se centrifugó. Entonces, las células se resuspendieron en 40 ml de DMEM, 10 % de suero de ternero fetal, 1x aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio 1 mM (Invitrogen) y 2 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN), luego se sembraron en placas de 10 cm. Todas las células se criopreservaron tras alcanzar la confluencia. Se usaron un feto macho (PCFF4-3) y dos fetos hembra (PCFF4-6, PCFF4-8) para transfección. Se introdujo ADN de vector linealizado pPL708 (0,5-10 µg) en ,5 - 2 millones de células por electroporación usando un ECM2001 Electroculture Manipulator (BTX Inc., San Diego, CA). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células transfectadas se sembraron en placas de 48 pocillos a una densidad de 2.000 células por pocillo y se seleccionaron con 250 µg/ml de G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células de pocillos confluentes se recogieron de las placas y se dividieron en dos para cribado por PCR y criopreservación para SCNT.

Las transfecciones se realizaron para producir colonias resistentes a G418, que luego se cribaron para la presencia del evento de elección de diana. Se determinaron tres colonias que albergaban el evento de elección de diana deseado por PCR y transferencia Southern (estrategia de cribado como se representa en la Figura 2).

Cribado por PCR de clones de fibroblasto resistentes. Se lisaron células PPFF con Tris 40 mM a pH 8,9, 0,9 % de Triton X100, 0,9 % de Nonidet P40, 400 ug/ml de proteinasa K de Invitrogen o Sigma, St. Louis, MO) a 60 °C durante 30 minutos. Los cebadores directos e inversos usados para detectar la elección de diana de 5' fueron: HCKOXba5'2: tctagaagacgctggagagaggccag; 5'armS: taaagcgcatgctccagactgcctt, respectivamente. Las condiciones de PCR fueron 65 °C 15 minutos y 95 °C 10 minutos, luego se añadió una mezcla a todas las muestras que contenía agua, cebadores, Takara 10x tampón, dNTP y Taq. Las condiciones de PCR continuaron como 94 °C 2 minutos (94 °C 30 segundos, 66 °C 30 segundos, 72 °C 5 minutos (35 ciclos)), 68 °C 7 minutos. Los cebadores directos e inversos usados para detectar la elección de diana de 3' fueron: Neo442S: catcgcttctatcgcttctt; 650+ca: aagtacttgccgctctcagga, respectivamente. Las condiciones de PCR fueron similares, excepto que la desnaturalización fue durante 10 segundos, la temperatura de hibridación fue 65 °C y la extensión fue a 68 °C durante 10 minutos, todos durante 30 ciclos. Los cebadores se prepararon por Sigma.

Ejemplo 3: Transferencia nuclear de células somáticas para producir cerdos Hc KO heterocigóticos.

Procedimiento de transferencia nuclear de células somáticas (SCNT). Se usaron células de una de las tres colonias correctamente elegidas como diana obtenidas de la transfección de pPL708 en la línea celular femenina PCFF4-8 como donantes nucleares para SCNT. Se realizaron procedimientos de SCNT en ovocitos madurados *in vitro* (BoMed, Madison, WI y/o TransOVA, IA) usando técnicas descritas en la bibliografía (Polejaeva, et al., (2000) Nature 407, 86-90, Dai et al., (2002) Nature Biotechnology 20, 251-255, Campbell et al., (2007) Theriogenology 68 Suppl 1, S214-231, Vatja et al., (2007) Reprod Fertil Dev 19, 403-423). La fusión eléctrica y activación de ovocitos reconstruidos se realizó usando un ECM2001 Electrocult Manipulator (BTX Inc., San Diego). Se cultivaron embriones fusionados por transferencia nuclear en medio NCSU-23 durante 1-4 h a 38,5 °C, y a continuación se transfirieron al oviducto de una cerda primeriza receptora de celo sincronizado. Las cerdas primerizas cruzadas (grandes blancas/Duroc/Landrace) (280-400 lbs) se sincronizaron como animales receptores por administración por vía oral de 18-20 mg de Regu-Mate (Altrenogest, Hoechst, Warren, NJ) mezclado en su pienso. Regu-Mate se alimentó durante 14 días consecutivos. Se administró intramuscularmente gonadotropina coriónica humana (hCG, 1000 unidades; Intervet America, Millsboro, DE) 105 h después del último tratamiento con Regu-Mate. Las transferencias de embriones se hicieron 22-26 h después de la inyección de hCG. Los presentes inventores usaron gonadotropina sérica de yegua gestante (PMSG, 1000 UI) y hCG (500 UI) en el día 10 y 13 después de la transferencia para el mantenimiento del embarazo. El embarazo se confirmó mediante ultrasonografía 28 días después de la transferencia. Los embarazos se monitorizaron a partir de aquí semanalmente. Todos los lechones nacieron por parto natural.

Se reconstruyeron un total de 682 ovocitos y se transfirieron a 3 cerdas primerizas receptoras. Las 3 cerdas primerizas estuvieron preñadas después de la transferencia de embriones. Un receptor se sacrificó para recoger en el día 45 fetos, y se aislaron fibroblastos fetales primarios para análisis adicionales, futura re-clonación y/o modificación genética adicional. Los dos receptores restantes llevaron sus embarazos a término y produjeron nueve lechones hembra. Se confirmó que cinco de los nueve lechones eran Hc +/- por transferencia Southern (datos no mostrados). Todos los lechones Hc +/- fueron sanos, llegaron a la pubertad y se usaron para la cría y posterior producción de cerdos Hc +/- masculinos maduros. Se produjeron cerdos Hc +/- adicionales usando células de una segunda colonia dirigida a Hc en SCNT, y también por re-clonación usando células derivadas del feto 708C4:1-4 (colección detallada anteriormente) en SCNT.

Ejemplo 4: Cruce de cerdos Hc KO heterocigóticos para producir lechones neonatales Hc KO homocigóticos.

Como se ha tratado, la única JH funcional dentro del locus Hc se delecionó por elección de diana génica, y debe prevenir eficazmente el apropiado reordenamiento VDJ del locus Hc. Para confirmar la hipótesis que predice que la ausencia de reordenamiento VDJ productivo abole la expresión de Ig, supervivencia de linfocitos B y desarrollo folicular en cerdos Hc -, se realizó caracterización fenotípica en la primera camada de 9 lechones, obtenidos de un cruce Hc +/- por Hc +/-, en el día del parto, antes de permitir amamantamiento por los lechones, con el fin de prevenir cualquier contaminación cruzada de Ig de la cerda al lechón neonatal. Un apareamiento tal debe generar uno de 4 genotipos diferentes, que bajo genética mendeliana clásica se espera que siga la relación 1 Hc +/- WT : 2 heterocigotos Hc +/- : 1 homocigoto Hc -/-. Se realizó genotipado por análisis de transferencia Southern como se muestra en la Figura 2B y se enumera en la Tabla 1.

Tabla 1. Niveles de Ig en los sueros de compañeros de camada de diversos genotipos.

Lechón#	Hc	Conc. [mg/ml]a	IgG	IgA
		IgM		
1	+/-	1.88±0.08	9.04±0.9	1.57±0.15
2	+/-	1.91±0.04	15.28±1.1	2.25±0.18
3	-/-	ND	ND	ND

	Lechón #	Conc. [mg/ml] ^a			
		Hc	IgM	IgG	IgA
5	4	+/-	1.01+0.06	5.61+0.2	2.78+0.21
	5	+/-	1.48+0.1	7.48+0.3	1.27+0.19
	6	+/+	1.28+0.15	18.42+1.2	2.58+0.37
	7	+/-	NA	NA	NA
	8	+/-	3.84+0.13	9.47+0.5	2.91+0.39
10	9	-/-	ND	ND	ND

^aND = debajo del límite de detección 0.4-0.6 ng/ml; NA = serum no disponible para test; + = Error estándar de

La Figura 2B muestra los resultados de transferencia Southern de esta camada tras el cruce Hc +/- por Hc +/- . De entre 9 lechones, el lechón 6 fue Hc +/+ (no mutante, WT), los lechones 1, 2, 4, 5, 7 y 8 fueron Hc +/- y los lechones 3 y 9 fueron Hc -/-. El porcentaje de lechones Hc -/- obtenidos de esta camada (22,2 %) es próximo al que cabría esperar bajo genética mendeliana (25 %). La caracterización fenotípica de esta camada se detalla en el Ejemplo 6.

Ejemplo 5: Genotipado de lechones Hc KO homocigóticos.

Análisis de transferencia Southern de cerdos. Se lisaron tejidos de cerdo durante la noche a 60 °C en una estufa de incubación con agitación en disolución de lisis (Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 0,15 M, EDTA 10 mM, 1 % de SDS, 25 % de perclorato de sodio, 1 % de 2-mercaptoetanol y 200 ug/ml de proteinasa K (20 mg/ml)). Se extrajo ADN con fenol/cloroformo y se precipitó con alcohol isopropílico. El ADN resolubilizado se trató con RNasa A (1 mg/ml) y RNasa TI (1.000 U/ul) a 37 °C durante 1 h, a continuación con proteinasa K (20 mg/ml) a 55 °C durante 1 h, seguido de extracción con fenol/cloroformo y luego se precipitó con etanol y se resuspendió en tampón TE. Se digirieron 20 ug de ADN con NcoI o Xba I. El ADN digerido se precipitó con etanol, se resuspendió en TE y se separó sobre un gel de agarosa al 0,8 %. Después de la electroforesis, el ADN se transfirió a una membrana de nailon usando procedimientos convencionales y se sondó con una sonda de Hc Cμ marcada de digoxigenina para la digestión con NcoI:

```

GGCTGAAGTCTGAGGCCTGGCAGATGAGCTTGGACGTGCGCTGGGGAGTA
CTGGAGAAGGACTCCCGGGTGGGGACGAAGATGTTCAAGACGGGGGGCT
GCTCCTCTACGACTGCAGGCAGGAACGGGGCGTCACTGTGCCGGCGGCAC
CCGGCCCCCGCCCCGCCACAGCCACAGGGGGAGCCCAGCTCACCTGGCCC
AGAGATGGACACGGACTTGGTGCCACTGGGGTGCTGGACCTCGCACACCA
GGAAGGCCTCTGGGTCCTGGGGGATGCTCACAGAGGGTAGGAGCACCCG
GGAGGAGGCCAAGT;

```

o se sondó con una sonda de JH marcada de digoxigenina para la digestión con XbaI:

```

CTCTGCACTCACTACCGCCGGACGCGCACTGCCGTGCTGCCCATGGACCA
CGCTGGGGAGGGGTGAGCGGACAGCACGTTAGGAAGTGTGTGTGTGCGC
GTGGGTGCAAGTCGAGCCAAGGCCAAGATCCAGGGGGCTGGGCCCTGTGCC
CAGAGGAGAATGGCAGGTGGAGTGTAGCTGGATTGAAAGGTGGCCTGAA
GGGTGGGGCATCCTGTTTGGAGGCTCACTCTCAGCCCCAGGGTCTCTGGTT
CCTGCCGGGGTGGGGGGCGCAAGGTGCCTACCACACCCTGCTAGCCCCTC
GTCCAGTCCCGGGCCTGCCTCTTACCACGGAAGAGGATAAGCCAGGCTG
CAGGCTTCATGTGCGCCGTGGAGAACCCAGTTCGGCCCTTGGAGG.

```

Se detectaron bandas usando un sistema de sustrato quimioluminiscente (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN).

La Figura 2B muestra XbaI digerido y la transferencia Southern sondada realizada en la camada 150-4 tras el cruce Hc +/- x Hc +/- . Nacieron lechones Hc +/+ (no mutantes, WT, número 6), Hc +/- (heterocigóticos, números 1, 2, 4, 5, 7 y 8) y Hc -/- (homocigóticos, números 3 y 9).

Ejemplo 6: Caracterización fenotípica de cerdos Hc KO homocigóticos.

Manipulación de lechones fenotípicamente caracterizados. Camadas de cerdos Hc +/- cruzados se genotiparon por transferencia Southern (véase la Figura 2B y la Tabla 1). Para todos los experimentos, no se dejó que la camada 150-4 que contenía lechones no mutantes (WT), Hc +/- y Hc -/- mamara para prevenir la contaminación cruzada de Ig del calostro de la cerda y se muestrearon para análisis fenotípicos en el día del parto. Otras camadas producidas a partir del cruce de cerdos Hc +/- se criaron usando procedimientos convencionales y posteriormente se destetaron a aproximadamente 4 semanas de edad. Algunos de estos cerdos Hc -/- también se probaron a las 8 semanas de edad en algunos ensayos. También se realizó la autopsia en algunos lechones después del destete que se sacrificaron, basándose en recomendaciones veterinarias, para consideraciones de salud, con el fin de determinar la causa de muerte y hallazgos macroscópicos e histológicos. Los animales se manipularon según los protocolos del IACUC revisados y aprobados.

Citometría de flujo. Se sangraron los lechones por punción venosa y se recogió en 20 U/ml de heparina (Baxter, Deerfield, IL). Se eliminaron por lavado las plaquetas y los glóbulos rojos se lisaron con BD Pharm Lyse (BD Biosciences, San Jose, CA) usando procedimientos convencionales. Se tiñeron un millón de glóbulos blancos (WBC) por tubo. Para la tinción individual, Ab primarios incluyeron ratón anti-IgM porcino (M160; IgG1 de ratón, una amable donación de K. Nielsen, ADRI, Canadá) y un control de isotipo IgG1 de ratón (MOPC-31C, BD Biosciences). El Ab secundario fue cabra anti-IgG1 de ratón conjugado con RPE (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Los Ab primarios se incubaron durante 45 min a 4 °C y los Ab secundarios durante 30 min a 4 °C. Las muestras se lavaron con tampón de tinción BSA (BD Biosciences) entre incubaciones de Ab. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo FACSaria usando el software BD FACSDiva (BD). La selección de linfocitos se determinó por diagrama de dispersión usando protocolo estándar. Se contaron al menos 10.000 linfocitos por ejecución.

Se tiñeron glóbulos blancos porcinos (WBC) con tanto Ab anti-Hc porcino (clon M160) como control de isotipo IgG1 de ratón y se analizaron por citometría de flujo. No se encontraron linfocitos que expresaran IgM sobre su superficie en los cerdos Hc -/- (Figura 3). A diferencia, en el lechón Hc +/- mostró 30,8 % de linfocitos IgM+, y los seis lechones Hc +/- tuvieron un intervalo del 16,8 % al 25,9 % de linfocitos IgM+ (datos no mostrados). Se obtuvieron datos similares en camadas posteriores que se dejaron mamar, se criaron normalmente y se destetaron a las 4 semanas de edad. Se realizó citometría de flujo en los lechones de estas camadas a las 8 semanas de edad y ningún cerdo Hc -/- tuvo linfocitos IgM+ detectables (Figura 8)

Medición de Hc, cadena ligera y transcripción de linfocitos T. Se amplificaron transcritos que codifican IgM, IgG y IgA porcinos por RT-PCR a partir de ARN esplénico usando los conjuntos de cebadores descritos en la Tabla 2 y previamente (Butler et al (2001) J Immunol 167, 3239-3249).

Tabla 2. Cebadores usados para la amplificación de secuencias de Hc y TcR de Ig por PCR

	Primera ronda PCR	Segunda ronda PCR	
Isotopo	Delantero	Delantero	Trasero
Cm	gaggagaagctggtggagt	tctcctgtgttgctctgg	ggggacgaagatgttcaagac*
Cy	gaggagaagctggtggagt	tctcctgtgttgctctgg	ccaccaccacgcacgtga*
Cα	gaggagaagctggtggagt	tctcctgtgttgctctgg	gagccccggagcaggtct*
TCRβ	Líder mix #		tctccgctccgatgttca
* Las dos rondas Hc PCR was hemi-nested and used the same reverse primer. # El Líder mix consiste en una mezcla de los tres primeros que juntos van a ampliar todas las familias TCRβ. Estas secuencias líderes son atgkgcatcggggtkctctg, atgsgctccakgctccttg, y atgctcaccgggaaccttg.			

Estos conjuntos de cebadores generaron productos de PCR de diagnóstico que se han confirmado por análisis de secuencias. También se usaron aquellos usados para la amplificación de receptor de linfocitos T (TcR)β. Pueden encontrarse secuencias de cebadores en la Tabla 2 .

El análisis de transcripción de diferentes isotipos de Ig ha mostrado que los lechones del genotipo Hc -/- carecen de transcritos para IgA, IgG y IgM en bazo (Figura 4A) y ganglio linfático (LN; datos no mostrados). Los animales Hc -/- también carecen de transcritos para IgM, pero no en WBC Hc +/- . Como la transcripción y expresión de IgG e IgA dependen de los linfocitos B que inicialmente expresan IgM con el fin de experimentar conmutación de clase de isotipo, solo se probó la transcripción de IgM en glóbulos sanguíneos de cerdo. Los resultados de RT-PCR también muestran que la alteración del locus de Hc no produjo ninguna diferencia detectable en la transcripción de TCRβ (Figura 4C). Debido al gran número de miembros de la familia de TcRβ y las múltiples secuencias de cebadores usadas aquí para RT-PCR de TcRβ, se esperaron muchas bandas con diferentes tamaños, previniéndose la formación de un patrón de bandas claramente nítido.

Medición de Ig de plasma. Se realizaron ELISA de sándwich en muestras de plasma heparinizado de los lechones para cuantificar los niveles de IgM, IgG y IgA porcinos usando procedimientos bien establecidos (Butler et al (2000) Immunology 100, 119-130). Estos procedimientos tienen bajos límites de detección de 0,4, 0,4 y 0,6 ng/ml,

respectivamente, para las Ig porcinas.

El nivel de IgM, IgG y IgA en suero se determinó por ELISA en lechones Hc +/+, Hc +/- y Hc -/-. Los datos en la Tabla 1 confirmaron que los cerdos del genotipo Hc -/- dejaron de sintetizar Ig para secreción, corroborando la falta de expresión superficial de células IgM+ por citometría de flujo. Los cerdos Hc +/- mostraron un intervalo de niveles en suero de Ig (Tabla 1). La variabilidad en los niveles de producción de Ig se ha observado previamente dentro de lechones WT estándar usados en agricultura (J.E. Butler, comunicación personal).

Histología, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Se extrajeron LN mesentéricos y tanto se fijaron en 10 % de formalina como se congelaron en bloques de OCT (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Los tejidos fijados en formalina se bloquearon en parafina y se cortaron a 5 µm para tinción con tinción con hematoxilina y eosina (H + E) o inmunohistoquímica automática (IHC). Se realizó tinción con H y E usando procedimientos convencionales. La tinción IHC automática usando fosfatasa alcalina como sustrato se realizó para marcadores B y T para cerdos usando el sistema Ventana TM siguiendo las instrucciones del fabricante. Se tiñeron linfocitos B de cerdo usando un Ab de ratón anti-CD79 alfa humano (IgG1 de ratón; clon HM57; DakoCytomation, Carpinteria, CA). Se tiñeron linfocitos T de cerdo con un conejo anti-CD3 humano (IgG de conejo; DakoCytomation). Ambos marcadores reaccionan de forma cruzada con las proteínas homólogas en el cerdo. Se cortaron secciones congeladas a 5 µm en un crióstato y se tiñeron con anti-cadena ligera kappa porcina 27.2.1, anti-cadena ligera lambda porcina 27.7.1 (Sinkora et al., (2001) Veterinary Immunology and immunopathology 80, 79-91) y anti-IgM porcina M160. Todos fueron Ab monoclonales de isotipo IgG1 de ratón. Se usó IgG1 de ratón (IgG1 de ratón; clon MOPC-31C) como control de isotipo. Se realizó tinción inmunofluorescente (SI) usando un procedimiento de 3 etapas. Se secaron secciones congeladas y se fijaron en acetona fría (Sigma), seguido de bloqueo con avidina-biotina (Invitrogen). También se incluyeron etapas de bloqueo del suero de especies huésped de Ab secundarios (Jackson ImmunoResearch). Los Ab primarios se diluyeron en diluyente de anticuerpo (Invitrogen) y se realizaron incubaciones durante 1 h a temperatura ambiente en una cámara humidificada. El Ab secundario usado fue burro anti-IgG de ratón biotinilado (Jackson ImmunoResearch). El Ab terciario usado fue estreptavidina conjugada con fluoresceína (Jackson ImmunoResearch). Los portaobjetos se lavaron en PBS entre etapas, se cubrieron con cubreobjetos usando cubreobjetos de 22 x 30 mm (VWR, West Chester, PA) y se preservaron usando Slowfade con DAPI (Invitrogen). Se tomaron imágenes histológicas y de IHC representativas usando una cámara Nikon Digital Sight DS-L1 en un microscopio Nikon Eclipse E400, y se analizaron usando el software Nikon ACT-1 (Nikon, Melville, NY). Se tomaron imágenes de IF representativas usando una cámara Olympus DP71 en un microscopio Provis, y se analizaron usando el software controlador DP (Olympus, Center Valley, PA).

Posteriormente se realizó tinción por inmunofluorescencia (IF) sobre LN, para confirmar la ausencia de cualquier linfocito B unido a tejido linfoides secundario que expresa cualquier Ig de Hc o de cadena ligera en cerdos Hc -/-. Esto se hizo por tinción para IgM porcina, y por tinción para cada una de las dos posibles cadenas ligeras, concretamente kappa y lambda. LN WT y Hc +/- mostraron patrones de tinción similares en folículos de LN. LN Hc -/- mostraron tinción negativa para IgM de cerdo, además de cadena ligera kappa o lambda de cerdo (Figura 5).

Los lechones Hc -/- no mostraron Ig secretada de ningún isotipo (Tabla 1), ni transcripción de ningún isotipo de Ig (Figura 4), y ninguna Ig que contuviera cadena ligera kappa o lambda (Figura 5), demostrando que Hc -/- carecen completamente de todos los isotipos de Ig, y todas las cadenas de proteína Ig (cadena pesada o ligera), tanto de superficie como secretadas.

Histológicamente, como se muestra en la Figura 6, se observaron muchos folículos normales en el lechón HC +/+. Los folículos pueden identificarse como estructuras organizadas en la médula, predominantemente constituidos de una densa población de linfocitos que rodean una población menos densa de células presentadoras de antígeno intercaladas y centralmente localizadas (es decir, células dendríticas foliculares en el centro germinal). A diferencia, se observó una zona de organización de estructura folicular y morfología en los LN de los lechones Hc +/-, que incluye algunos folículos y centros germinales casi normalmente desarrollados, algunas estructuras foliculares con centros germinales aparentemente subdesarrollados (como se muestra en la Figura 6) y algunas con regiones densas dispersas de poblaciones de linfocitos que muestran en absoluto poco parecido con los folículos. En general, el diámetro del folículo promedio y tamaño del centro germinal promedio es más pequeño en los lechones Hc +/- que en el lechón Hc +/+. Significativamente, no se observó formación de folículos u organización de centros germinales en ninguno de los lechones Hc -/- (Figura 6).

Se realizó inmunohistoquímica (IHC) para marcadores de linfocitos T y B (Figura 7). Se observaron estructuras foliculares claras bien definidas en LN Hc +/+, con linfocitos B muy apretados en y alrededor de los centros germinales, y linfocitos T que dominan la región paracortical entre folículos. Los LN de LN Hc +/+ y Hc +/- mostraron características de la zona de linfocitos T y B similares. Por el contrario, los LN Hc -/- carecieron completamente de linfocitos B. Los números de linfocitos T aparecieron en gran medida sin afectar en los lechones Hc -/-, en comparación con los otros genotipos.

Los lechones Hc -/- también mostraron morfología linfoides significativamente alterada (Figura 6). En LN Hc +/+, los linfocitos B se agruparon en folículos, comprendidos principalmente de linfocitos B y una célula especializada del estroma, la célula dendrítica folicular. Los folículos primarios tienen una red compleja de estas células presentadoras de antígeno especializadas, que forman centros germinales que son conocidos por hacer una contribución

fundamental a los eventos selectivos que subyacen a la respuesta de Ab. Para linfocitos B que van a activarse, rodean el centro germinal, y los linfocitos T dentro de las zonas presentes sobre el lado opuesto del folículo proporcionan colaboración de linfocitos T después de la estimulación del antígeno. Se encontró que la estructura folicular estaba alterada en lechones Hc +/-, y totalmente ausente en lechones Hc -/-. La ausencia de linfocitos B en los lechones Hc -/ (Figura 7) sugiere que el desarrollo de estructura folicular es dependiente de linfocitos B.

Además, el análisis de cinco de los lechones Hc-/- generados a partir del cruce, que se dejaron mamar, y se destetaron a las cinco semanas de edad, que se les hizo la autopsia una a ocho semanas después del destete, mostraron la presencia de infecciones bacterianas oportunistas, ningún folículo o centros germinales en ganglios linfáticos o bazo, y una escasez de parches de Peyer en la sub-mucosa intestinal.

Análisis fenotípico resumen de cerdos HC -/-. Lechones Hc -/- no tuvieron Ig en suero, y ninguna IgM o cadena ligera de Ig se expresó en linfocitos en circulación, o en tejido linfóide. Además, estos cerdos nulos en Hc no tuvieron transcritos para ningún isotipo Ig importante en LN o bazo, y ningún transcrito para IgM en WBC. Se demostró que los lechones Hc -/- carecían de linfocitos B, y no tuvieron desarrollo folicular observable en tejido linfóide. Los resultados de los presentes inventores también mostraron que la delección dirigida de ambos alelos en el locus de Hc no tuvo efecto negativo sobre la transcripción del receptor de linfocitos T (específicamente TcR β). Además, LN Hc -/- contuvieron aproximadamente la misma proporción de linfocitos T que LN de compañeros de camada WT por IHC, que indica que los cerdos Hc -/- tienen un compartimento de linfocitos T aparentemente normal.

Ejemplo 7: Producción de cerdos nude

El gen que se muta en el ratón para producir el fenotipo nude se ha caracterizado y llamado whn o FOXN1 que representa hélice alada en la caja nude o forkhead N1 (Nehls et al., (1994) Nature 372, 103-107, Segre et al., (1995) Genomics 28, 549-559). También se denomina comúnmente el gen "nude". El producto génico de whn es un factor de transcripción que participa en el inicio y el mantenimiento del fenotipo diferenciado de células epiteliales tímicas. También se requiere para la apropiada queratinización del tallo del pelo (Schorpp et al., (1997) Immunogenetics 46, 509-515).

En el ratón, la mutación del gen nude se caracteriza como una delección de un par de bases (pb) (de la base G) en el exón 3 del gen FOXN1/whn que produce un desplazamiento del marco, de forma que la transcripción se termina prematuramente por un codón de terminación resultante en el exón 6 (Nehls et al., (1994) Nature 372, 103-107). La región del exón 6 del gen de ratón codifica el dominio de unión a ADN de este factor de transcripción, por tanto, la mutación puntual produce una pérdida del dominio de unión al ADN, por tanto, dando un factor de transcripción no funcional. Mutaciones similares del gen FOXN1 también se han descrito en los genes de rata y humanos. El resultado de estas mutaciones (en todas las especies) es un fenotipo sin pelo, atímico inmunodeprimido (Coffer et al., (2004) Nature reviews 4, 889-899).

Las secuencias de ratón para el gen FOXN1 (nude) están disponibles en GeneBank (secuencias representativas incluyen el nº de acceso X81593, ARNm de ratón; nº de acceso AL591131, secuencia de genes de ADN genómico de ratón). Además, los genes FOXN1 de ratón, rata y humano (también conocidos como whn o nude) y su estructura se han caracterizado completamente, y los autores determinaron que la estructura del exón/intrón del gen nude humano está en completa concordancia con el gen nude de ratón (Schorpp et al., (1997) Immunogenetics 46, 509-515). Así, se espera que el gen FOXN1/whn porcino comparta homología similar con el gen de ratón en cuanto al ser humano. Los resultados de un análisis de BLAST muestran que el ARNm de ratón es el 85 % homólogo al ARNm aislado de una biblioteca de piel porcina (*Sus scrofa*) de ADNc (acceso de GeneBank DB803240). Por tanto, usando secuencias de ADN homólogas como sondas y secuencias de genes publicadas, puede clonarse el gen FOXN1 (pFOXN1) genómico porcino.

Usando secuencias de FOXN1 de ratón y humanas publicadas y las secuencias porcinas identificadas por la búsqueda con BLAST, se diseñan cebadores de PCR y se usan para amplificar ADN genómico porcino para producir clones genómicos que engloban las áreas del gen porcino deseado para la elección de diana génica, para crear una alteración o mutación en el gen pFOXN1. Los clones genómicos se mapean con restricción y se usan para diseñar brazos de recombinación para su uso en la construcción del vector dirigido a pFOXN1. Se construye un gen marcador en el diseño que elige diana para permitir la selección de células dirigidas. Estos vectores se usan en recombinación homóloga para alterar o inactivar el gen pFOXN1 en células porcinas primarias. Se conocen en la técnica métodos de clonación de genes, diseño de vectores de elección de diana génica y elección de diana génica por recombinación homóloga en células, y para la producción de gen dirigido a animales (véase, por ejemplo, Maniatis, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd Ed.), Dai et al., (2002) Nature Biotechnology 20, 251-255, publicación de EE.UU. Nº 2003-0024002).

En un método, el gen porcino es elegido como diana con un vector que elige diana tipo sustitución, de forma que tras la recombinación homóloga, el genoma porcino tiene una secuencia mutante que comprende una delección de un pb (G) en el exón 3 homólogo a la mutación encontrada en el genoma de ratón nude. En otro método, el gen pFOXN1 se dirige de forma que las áreas de los exones 5-7 que codifican el dominio de unión al ADN para el factor de transcripción de FOXN1 (Schorpp et al., (1997) Immunogenetics 46, 509-515) estén alteradas o delecionadas. Como

resultado de estas modificaciones al genoma porcino, no se transcribe proteína del factor de transcripción pFOXN1 funcional, produciendo el fenotipo nude mutante.

Se transfectan células porcinas con el (los) vector(s) que elige(n) diana *in vitro*, para producir células con alteraciones del gen pFOXN1. Se aíslan células que tienen los eventos de elección de diana correctos usando técnicas conocidas. Las células que son positivas para el evento de elección del gen como diana se usan entonces como donantes nucleares en procedimientos de transferencia nuclear porcina (como se detalla en el Ejemplo 3) para producir cerdos con el gen pFOXN1 seleccionado sobre un alelo (pFOXN1 KO heterocigóticos) o ambos alelos (pFOXN1 KO homocigóticos). Cerdos pFOXN1 KO heterocigóticos (pFOXN1(+/-)) se cruzan entre sí para producir cerdos nulos para pFOXN1 homocigóticos (pFOXN1(-/-)).

En ciertos casos, células pFOXN1(+/-), o células aisladas de cerdos o fetos pFOXN1(+/-), pueden utilizarse en una segunda ronda de elección de diana génica para dirigir el otro pFOXN1, generando así células porcinas pFOXN1(-/-). Estas células pFOXN1(-/-) se usan como donantes en transferencia nuclear para producir cerdos pFOXN1(-/-).

Cualquiera de las células porcinas dirigidas al gen pFOXN1, o células derivadas de cerdos pFOXN1 KO heterocigóticos y homocigóticos, puede usarse para rondas adicionales de modificación genética y transferencia nuclear para introducir otras modificaciones genéticas deseadas. Alternativamente, cerdos pFOXN1 KO pueden cruzarse con otras líneas de cerdos genéticamente modificados con el fin de combinar genotipos y/o fenotipos deseados. Por ejemplo, cerdos tales como cerdos RAG-1 KO, descritos en las solicitudes de patente de EE.UU. US20050155094 y WO03066855A1, pueden cruzarse con los cerdos Hc KO y/o cerdos pFOXN1 KO. Los cerdos Hc KO pueden usarse con los cerdos pFOXN1 KO y los cerdos RAG-1 KO en estudios paralelos para aclarar las funciones de las diversas partes de la respuesta inmunitaria (linfocitos B y T) tras la exposición a patógenos y/o tras tratamientos profilácticos.

Ejemplo 8: Producción y caracterización de cerdos transgénicos que expresan pCTLA4-Ig.

Se produjeron cerdos transgénicos que expresan un transgén pCTLA4. Estos cerdos, que tienen una respuesta de linfocitos T reducida y un fenotipo inmunodeprimido, pueden servir de modelos animales de investigación. Se construyó un vector para producir cerdos en los que una forma secretada de pCTLA4-Ig se expresó en exceso constitutivamente. Hubo expresión y funcionalidad robustas del transgén, que produjeron un fenotipo inmunodeprimido en estos animales.

Construcción de vector

Se insertó un fragmento de restricción Asc1/Mlu1 que codifica una proteína de fusión pCTLA4-Ig (Vaughn, et al., J Immunology, 165:3175-3181, 2000) que consistió en la región extracelular de ADNc de pCTLA4 unido con la bisagra y regiones CH2 y CH3 de IgG1 humana en un vector de expresión de mamífero que contiene un potenciador del CMV, promotor de B-actina de pollo, sitio de corte y empalme de globina de conejo y regiones de aislador que consisten en dos regiones de unión de matriz (MAR) MAR de 21q21 y MAR de β -globina (Figura 9).

Transfección

Se cotransfectaron fibroblastos fetales primarios de cerdos no mutantes (WT) o GTKO por electroporación con 1 μ g de construcción pCTLA4-Ig linealizada y tanto 0,1 μ g de vector pgkpuromicina como pgkneomicina. A las 48 h, las células se sembraron en placas de 48 pocillos a una concentración de 100-500 células/cm², y se seleccionaron con tanto 250 μ g/ml de G418 (Gibco BRL, Grand Island, NY) como 0,5 μ g/ml de puomicina (InvivoGen, San Diego, CA). Se cribaron clones seleccionados para el transgén pCTLA4-Ig por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y se reunieron clones positivos y se usaron para transferencia nuclear.

Transferencia nuclear

Se ha descrito el procedimiento de transferencia nuclear usado (Dai, et al., (2002) Nature Biotechnology 20, 251-255). Brevemente, se desnuclearon ovocitos madurados *in vitro* en la metafase II y una única célula de fibroblasto de linaje híbrido blanco grande WT, o GTKO de origen blanco grande, se dispuso entre la zona pelúcida y el citoplasma de cada ovocito desnucleado. Se indujeron la fusión y activación con un pulso eléctrico (1,4 kV/cm). Los embriones se transfirieron al oviducto de una cerda primeriza receptora de celo sincronizado en el plazo de 1-4 h después de la activación.

Cría de animales

Todos los animales, excepto aquellos para una camada, fueron paridos en alojamientos segregados para minimizar la exposición a patógenos. La otra camada que estaba en un fondo WT fue parida en un establo para cerdos estándar sin segregación de otros cerdos. Algunas camadas recibieron pienso que contenía tetraciclina (110 g de tetraciclina/kg de pienso) empezando al nacer y continuando hasta la eutanasia. Todos los animales que mostraron signos de infección recibieron tratamiento con 2,5 mg/kg de peso corporal de Draxxin (Pfizer, New York, NY) y 15

mg/kg de peso corporal de Nuflor (Schering-Plough, Kenilworth, NJ).

Durante un periodo de aproximadamente 6 semanas, se parieron 5 camadas, produciendo un total de 20 lechones. Tres camadas (11 lechones) resultaron de SCNT usando células transgénicas WT/pCTLA4-Ig, y dos camadas (9 lechones) se produjeron con células GTKO/pCTLA4-Ig. Todos fueron nacimientos vivos, excepto dos lechones en una camada de fondo WT. Con algunas excepciones, los pesos al nacer estuvieron en el intervalo normal. Al nacer, los animales mamaron bien y pareció que tenían buen aspecto. Ocho de los 11 lechones WT y siete de los nueve lechones GTKO fueron positivos para el transgén pCTLA4-Ig por análisis de Southern (no mostrado), una tasa de transgénesis del 75 %.

Análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizó cribado por PCR de células transfectadas en placas de 96 pocillos. Las células se rompieron en una disolución de lisado que consistía en Tris 50 mM (pH 8,0), NaCl 0,15 M, EDTA 10 mM, 1 % de dodecilsulfato de sodio (SDS), 25 % de perclorato de sodio, 1 % de 2-mercaptoetanol y 200 µg/ml de proteinasa K. Se usó ADN aislado de muestras de la cola de cerdo para PCR y análisis de Southern y se purificó por un procedimiento de Marmur modificado (Marmur, J et al., J Mol Biol, 3:208-218, 1961). Los cebadores de PCR se diseñaron para amplificar un fragmento que flanqueó la unión de la secuencia promotora y codificante de CTLA4-Ig.

Análisis de transferencia Western

Se prepararon tejido y lisados celulares mediante homogeneización en presencia de inhibidores de la proteasa (Thermo Scientific, Rockford, IL), seguido de la adición de SDS a una concentración final del 1 % y centrifugación para eliminar residuos celulares residuales. La concentración de proteína se determinó con un kit de ensayo de proteína BCA (Pierce, Rockford, IL). Se fraccionaron muestras desnaturalizadas por calor (10-20 µg de proteína) sobre geles en gradiente del 4-12 % de BisTris SDS (Invitrogen, Carlsbad, CA) bajo condiciones reducidas. Se usó CTLA4-Ig/Fc humano recombinante (R and D Systems, Mineápolis, MN) como proteína de control estándar. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se tiñeron con Memcode Protein Stain (Thermo Scientific, Rockford, IL) para la visualización de proteína total y se bloquearon con tampón de bloqueo de caseína (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). La membrana bloqueada se incubó en conejo anti-IgG1 humana-HRP (Binding Site, San Diego, CA), que reconoce la región de IgG1 humana de la cadena pesada de pCTLA4-Ig. Se detectaron bandas inmunorreactivas con el sustrato quimioluminiscente Super Signal West Pico (Thermo Scientific, Rockford, IL) y obtención de imágenes fotográficas.

Todos los cerdos que fueron transgénicos por análisis de transferencia Southern para pCTLA4-Ig también expresaron el transgén. El análisis de transferencia Western de lisados de cola (Figura 10a) indicó una robusta expresión en todos los animales, no obstante a diferentes niveles, con una banda importante de aproximadamente 56 kDa bajo condiciones reducidas y desnaturalizadas. En general, los lisados de órgano también presentaron altos niveles de expresión, que incluyen aorta, bazo, corazón, pulmón, riñón, hígado y páncreas (Figura 10b)).

ELISA cuantitativo de CTLA4-Ig de cerdo

Se cuantificó pCTLA4-Ig en suero de cerdo transgénico en un ensayo de ELISA. El anticuerpo de captura fue oveja anti-IgG1 humana (Binding Site, San Diego, CA) a 5 µg/ml. Se generó una curva patrón usando hCTLA4Fc (R&D Systems Inc., Mineápolis, MN). Se cargaron por triplicado diluciones apropiadas de sueros de cerdo de muestras sobre la placa y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadió oveja anti-IgG1 humana conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Binding Site, San Diego, CA) a dilución 1:5000 y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadió sustrato de peroxidasa 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) para el desarrollo de color.

Las concentraciones en suero de pCTLA4-Ig fueron bastante altas en todos los cerdos transgénicos, oscilando de aproximadamente 380 a 1600 µg/ml de suero (Figura 13).

ELISA cuantitativo de IgG e IgM de cerdo

Se cuantificó IgG e IgM de suero de cerdo usando kits de ELISA comerciales de IgG e IgM de cerdo (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX), que incluyeron todos los anticuerpos y suero de referencia. Los anticuerpos de captura fueron cabra anti-IgG de cerdo y cabra anti-IgM de cerdo a dilución 1:100. Se suministró un suero de cerdo de referencia con el kit para preparar diluciones para una curva patrón. Se cargaron por triplicado diluciones apropiadas de sueros de cerdo de muestras sobre la placa y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadió cabra anti-IgG de cerdo-HRP o cabra anti-IgM de cerdo-HRP a dilución 1:20000 a los pocillos y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadió TMB para el desarrollo de color.

Las concentraciones en suero de IgG e IgM se debilitaron en los cerdos pCTLA4-Ig (Figura 12). Los niveles de IgG fueron aproximadamente 10 veces inferiores a sus compañeros de camada no transgénicos (lechones 244.1 y 244.6 en las Figs. 12a y 12b). IgM también se debilitó, en algunos casos a menos de la mitad del nivel de un hermano no

transgénico. Todos los animales transgénicos, independientemente del alojamiento o tratamiento antibiótico, tuvieron este perfil de IgG e IgM en suero característico.

Hematología

Se realizó un panel estándar de pruebas de hematología en animales seleccionados en el Colegio Regional de Veterinaria de Virginia-Mariland, Instituto Politécnico de Virginia y Universidad Estatal, Blacksburg, VA.

Los análisis hematológicos indican que, en camadas producidas sin tratamiento con antibiótico, los cerdos transgénicos, a diferencia de sus compañeros de camada no transgénicos, tuvieron bajos números de leucocitos, que oscilan del 53 % al 71 % de los niveles normales. Las cifras de linfocitos también fueron inferiores a las normales en estos animales, oscilando del 14 % al 61 % de los niveles normales. Los cerdos transgénicos tratados con antibióticos mantuvieron niveles normales de glóbulos blancos y linfocitos.

Autopsia

Se realizaron las autopsias en animales seleccionados por el veterinario empleado en Revivacor, Inc, en el Colegio Regional de Veterinaria de Virginia-Mariland o en el Colegio de Veterinaria en la Universidad del Estado de Iowa, Ames, Iowa.

Se hizo la autopsia de tres de estos animales; en los tres caso se hizo un diagnóstico de septicemia. En un caso, *Streptococcus equisimilis*, un patógeno oportunista, se aisló como agente causante. No se cultivaron organismos de las otras dos autopsias; en estos casos, el diagnóstico se basó en hallazgos histológicos o patología macroscópica. Como tales infecciones agudas se desarrollaron en el plazo de algunas semanas después del destete, los anticuerpos maternos transmitidos en el calostro pueden haber proporcionado protección transitoria a estos lechones inmunodeprimidos. Los patógenos que se creyó que eran los agentes causantes para las infecciones purulentas observadas en al menos dos de estos animales son flora bacteriana normal en la instalación de cerdos de los presentes inventores, pero ninguno de los compañeros de camada transgénicos mostró ningún signo de enfermedad, a pesar de su estrecha proximidad a los animales infectados.

Las características de septicemia en la autopsia en tres cerdos pCTLA4-Ig/WT y los resultados de análisis serológicos, en particular los niveles de IgG en suero totalmente reducidos, indicaron un estado gravemente inmunodeprimido, y necesitaron la adición de antibióticos al pienso, además de disposiciones de instalaciones modificadas para minimizar la posibilidad de infección.

Histología

Se procesaron corazón, páncreas, riñón y tejidos de hígado de animales seleccionados y se congelaron en el compuesto OCT (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) en criomoldes y se guardaron a -70 °C. Se cortaron secciones congeladas (6 µm) para tinción inmunofluorescente por el Centro de Virginia/Mariland para Veterinaria sobre portaobjetos positivamente cargados. Se fijaron secciones en acetona (Sigma, St. Louis, MO) y se bloquearon con el kit de bloqueo de avidina/biotina (Invitrogen, Carlsbad, CA), además de suero de burro (Jackson ImmunoResearch, Westgrove, PA). Las secciones se tiñeron con oveja anti-IgG1 humana (Binding Site, San Diego, CA) o control de isotipo IgG de oveja (Jackson ImmunoResearch, Westgrove, PA) durante 1 h a temperatura ambiente en una cámara humidificada. Se usó un anticuerpo de burro anti-IgG de oveja biotinilado como secundario (Jackson ImmunoResearch, Westgrove, PA) en tanto las muestras experimentales como de control. Se usó estreptavidina conjugada con fluoresceína (Jackson ImmunoResearch, Westgrove, PA) como anticuerpo terciario. Las secciones se preservaron en Slow Fade (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se taparon con cubreobjetos para visualizar bajo el microscopio Olympus Provis y cámara DP71. Se tomaron imágenes usando el software DP (Olympus, Center Valley, PA).

El lechón 264.4 fue positivo por Western para pCTLA4-Ig en todos los tejidos probados; por tanto, se empleó inmunofluorescencia para visualizar y localizar más específicamente la expresión en tejidos relevantes para xenotrasplante, que incluyen corazón, páncreas, riñón e hígado (Fig. 11). Se encontró que la expresión era intensa y uniforme en todos los tejidos y en todos los tipos de células (que era esperado del promotor constitutivo CAG). Los tejidos de control de compañeros de camada WT fueron negativos para IgG1 humana. Los controles de isotipo del lechón pCTLA4 tuvieron menor expresión de fondo debido a la naturaleza policlonal del anticuerpo primario y la menor reactividad cruzada de IgG de oveja con inmunoglobulinas de otras especies, tales como IgG1 humana. Esto fue lo más notorio en el corazón.

Estos resultados demuestran que la expresión en exceso de pCTLA4-Ig en cerdos transgénicos puede producir un fenotipo inmunosuprimido. Estos animales mostraron niveles reducidos de inmunoglobulinas (IgG e IgM). Es probable que los altos niveles de pCTLA4-Ig producidos en la sangre y órganos de estos animales pudieran haber afectado la proliferación de linfocitos B dependiente de linfocitos T y la diferenciación y posterior producción de anticuerpos. Por cruce, reproducción asistida, o una combinación de estrategias transgénicas, los cerdos transgénicos pCTLA4-Ig podrían combinarse con la inactivación del gen HC de cerdo, para producir un animal con

deficiencias en tanto la función de linfocitos T como de linfocitos B. Un animal tal tendría amplia utilidad como modelo para el estudio de reacciones inmunitarias en cerdos, además de para estudiar tanto reacciones mediadas por humores como celulares a patógenos, antígenos, y para el desarrollo de vacunas.

5 **Ejemplo 10: Prueba de vacunas**

Se colonizarán cerdos con LA o LGG, se inocularán con la vacuna AttHRV y se expondrán a VirHRV. Un grupo se inyectará intravenosamente con ascitis de mAb anti-CD8 (anti-CD8 α) 6, 5, 4, 3, 2 y 1 días (PID 22-27) antes de la exposición a VirHRV (PID 28) para agotar completamente los linfocitos T CD8. La ascitis se pedirá de ImmunoPrecise (Victoria, Canadá). Después de una única inyección intravenosa del ascitis de mAb anti-CD8 de cerdo (0,7 ml/kg), las frecuencias de linfocitos T CD8+ en sangre de los cerdos se reducen a los menores niveles (0-5 % de células totales) 4-6 días después de la inyección. La completitud del agotamiento de linfocitos T CD8+ y CD4+CD8+, y las frecuencias de linfocitos T CD4+ se monitorizarán por citometría de flujo. Las respuestas de IFN- γ +linfocitos T CD4+ y IFN- γ + linfocitos T CD8+, CD4+IL-13+célula Th y células Treg específicas de rotavirus se medirán PID 28 y PCD 7. Los niveles en suero de citocinas Th1, Th2 y Th3 se medirán PID 0, 10, 21, 28 y PCD 2 y 7. Se monitorizarán la diseminación de virus y diarrea diariamente a partir de PCD 0-7. La viremia se monitorizará en PCD 2 y 7.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 1. Un método de prueba de la respuesta inmunitaria de un animal a un antígeno que comprende proveer un animal porcino genéticamente modificado que carece de expresión de la inmunoglobulina de la cadena pesada porcina funcional del antígeno y evaluar una respuesta del animal al antígeno, en el que el porcino tiene una alteración elegida como diana en ambos alelos de la región de unión J6 de la cadena pesada porcina, que produce una ausencia de producción de linfocitos B en el porcino.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que el porcino tiene una alteración en al menos un gen nativo adicional en su genoma.
3. El método de la reivindicación 2, en el que el porcino carece de o tiene una respuesta inmunitaria celular reducida.
- 15 4. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en el que el porcino incluye adicionalmente al menos un gen xenógeno o transgén.
5. El método de la reivindicación 4, en el que el porcino expresa adicionalmente al menos una proteína xenógena.
- 20 6. El método de la reivindicación 5, en el que la proteína adicional es una molécula de bloqueo coestimulante.
7. El método de la reivindicación 6, en el que la molécula de bloqueo coestimulante es la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4).
- 25 8. El método de la reivindicación 7, en el que CTLA4 está fusionada con una molécula de inmunoglobulina (Ig).
9. Un método de prueba de la utilidad de un profiláctico o terapéutico contra un agente infeccioso que comprende exponer un animal porcino genéticamente modificado que carece de expresión de la inmunoglobulina de la cadena pesada porcina funcional al agente infeccioso; tratar el porcino con el profiláctico o terapéutico; y evaluar la respuesta inmunitaria y evolución de la infección en el porcino; en el que el porcino tiene una alteración elegida como diana en ambos alelos de la región de unión J6 de la cadena pesada porcina, que produce una ausencia de producción de linfocitos B en el porcino.
- 30 10. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 9, en el que el porcino se expone a un agente infeccioso o antígeno de superficie del mismo.
- 35 11. El método de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que la evaluación incluye examen de respuestas celulares y humorales.
- 40 12. El método de la reivindicación 10, en el que el agente infeccioso es un virus.
13. El método de la reivindicación 9, en el que el profiláctico o terapéutico es una vacuna.
- 45 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en el que el animal expresa adicionalmente una proteína exógena.
15. El método de la reivindicación 14, en el que la proteína adicional es una inmunoglobulina humana o fragmento de la misma.
- 50 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el porcino tiene una delección elegida como diana de la región de unión J6 del gen de Ig de la cadena pesada porcina.

55

60

65

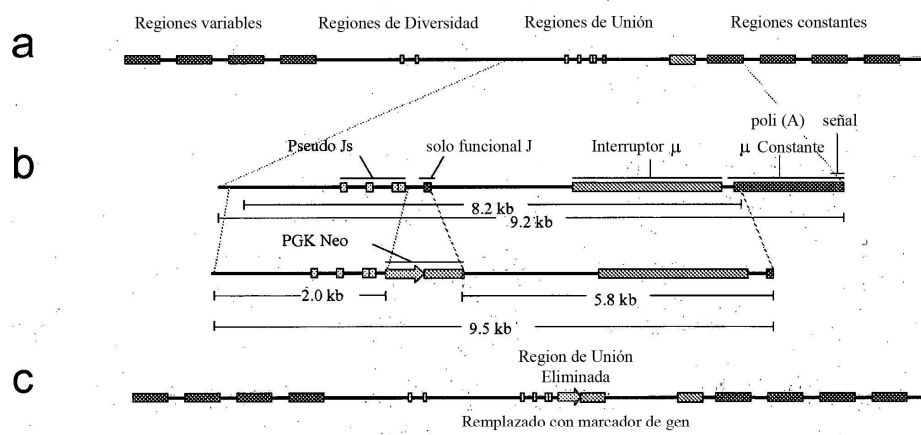


FIGURA 1

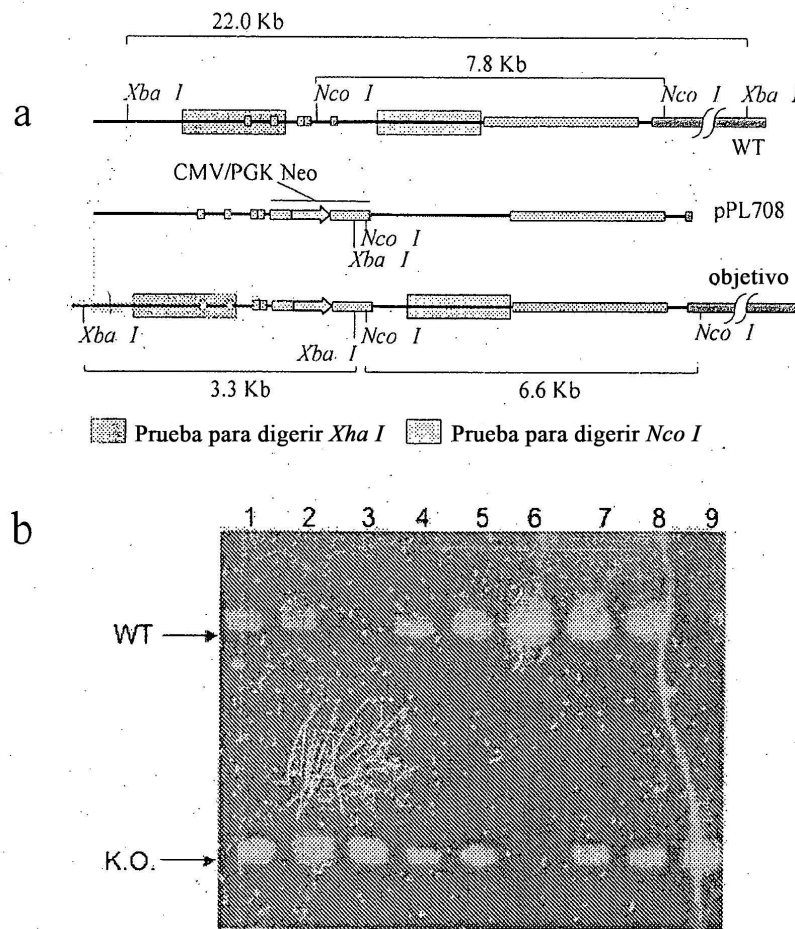


FIGURA 2

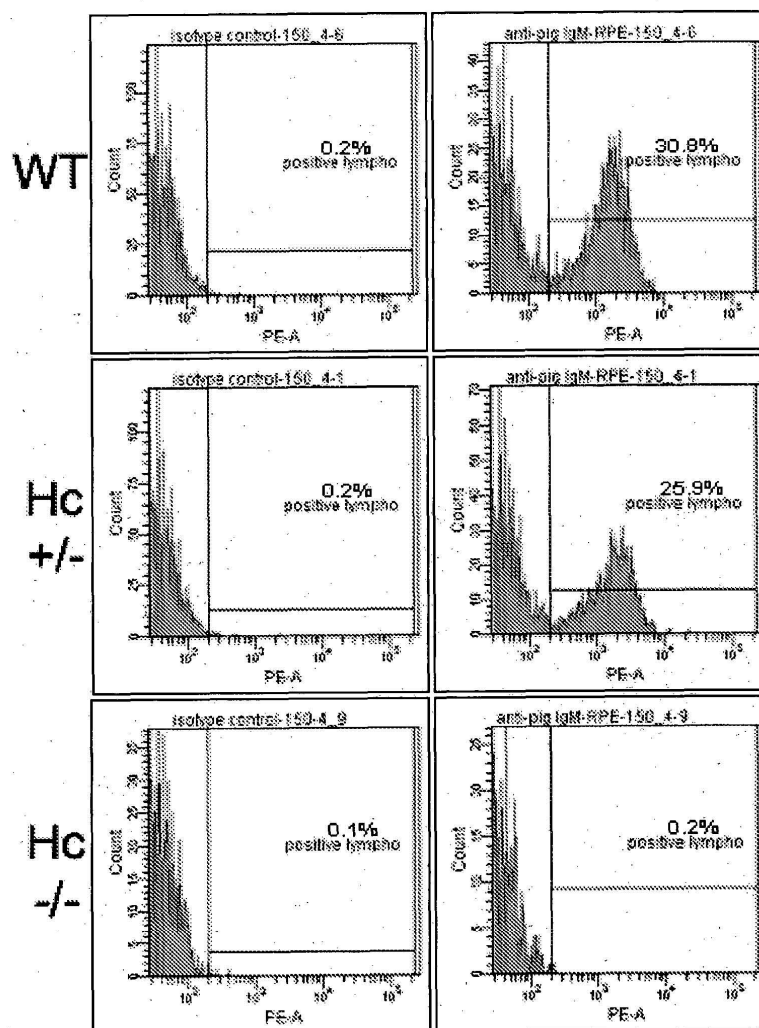


FIGURA 3

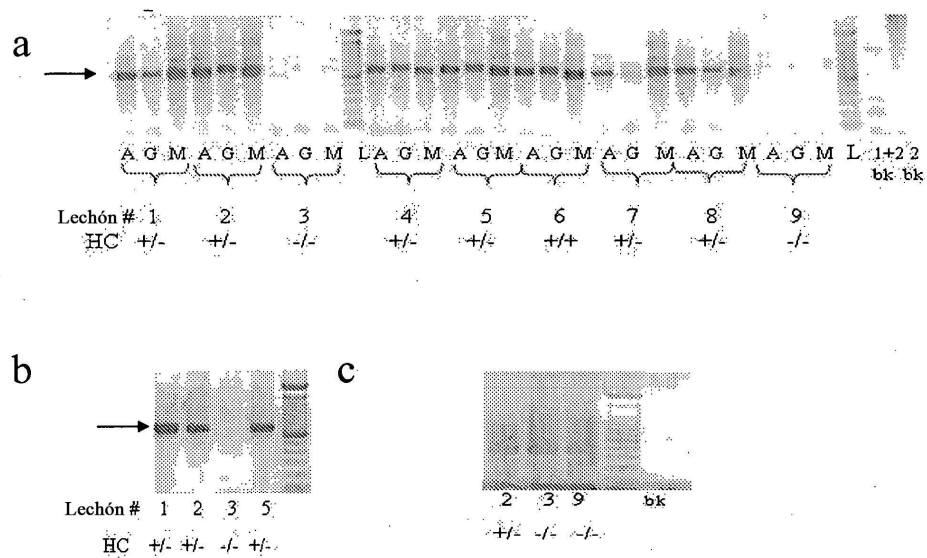


FIGURA 4

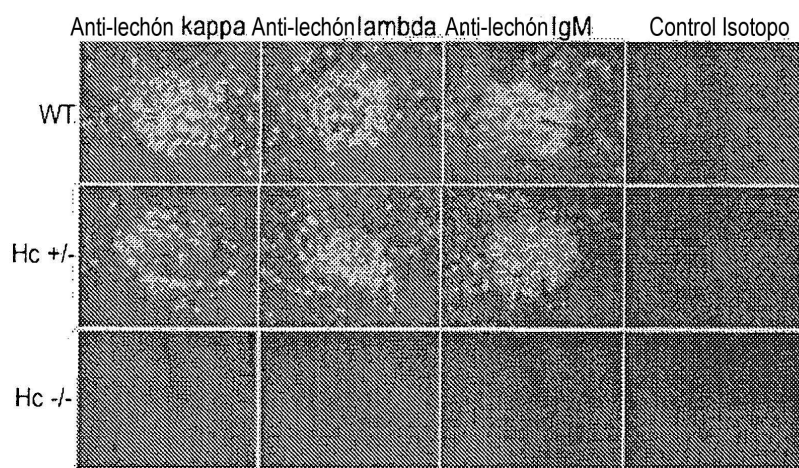


FIGURA 5

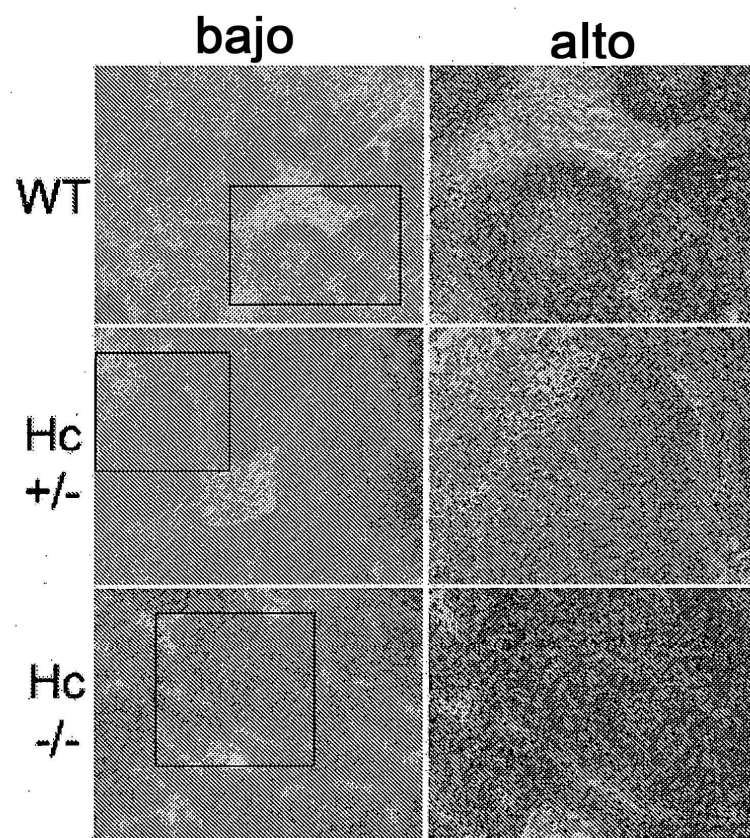


FIGURA 6

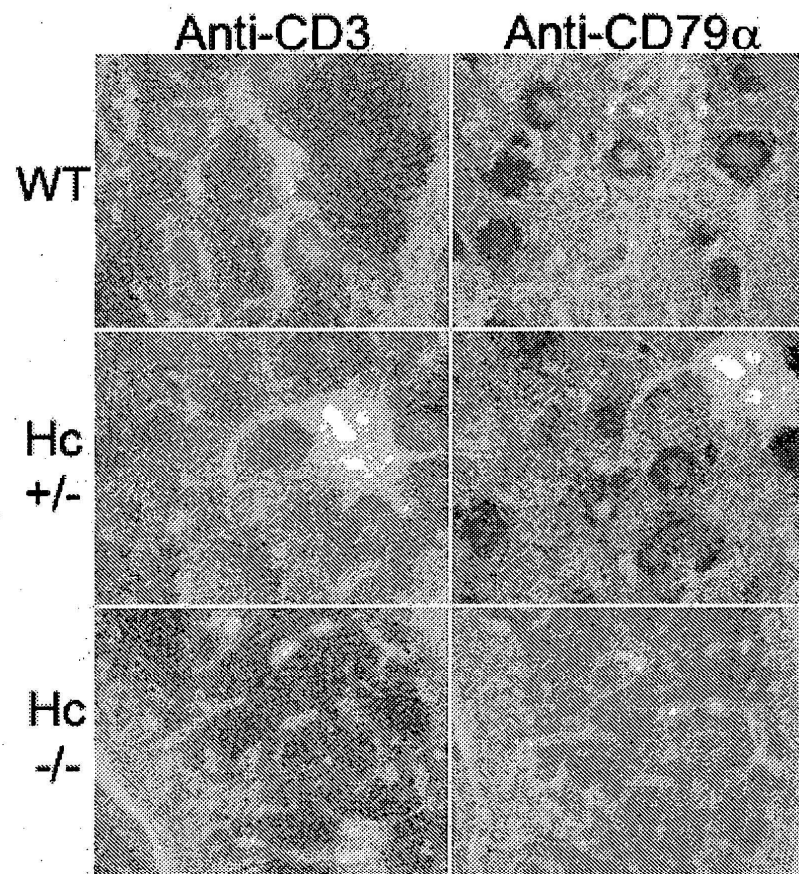


FIGURA 7

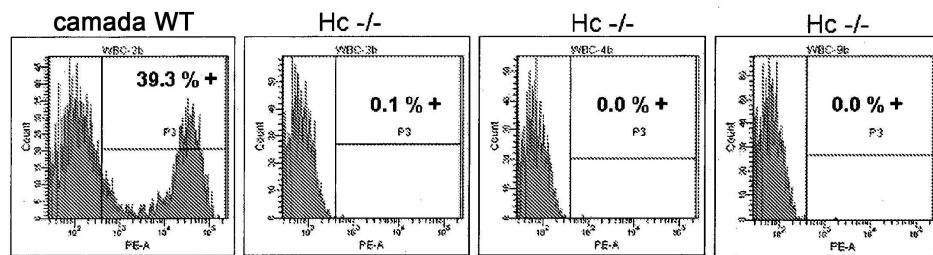


FIGURA 8

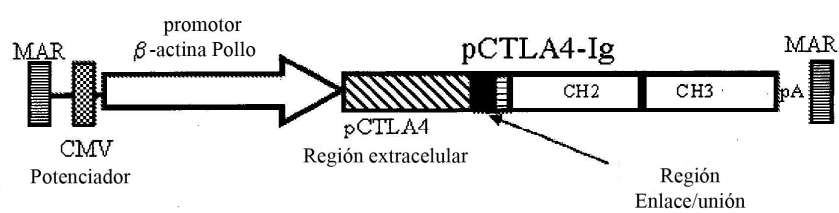


FIGURA 9

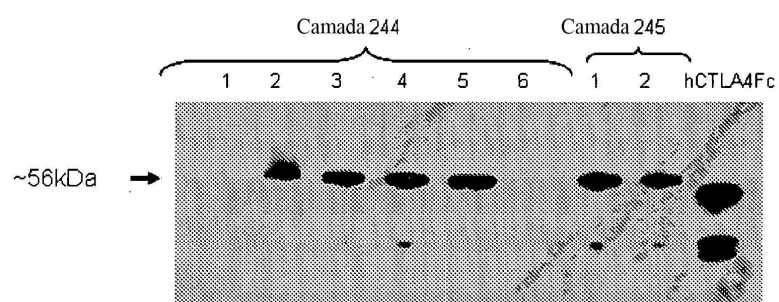


FIGURA 10a

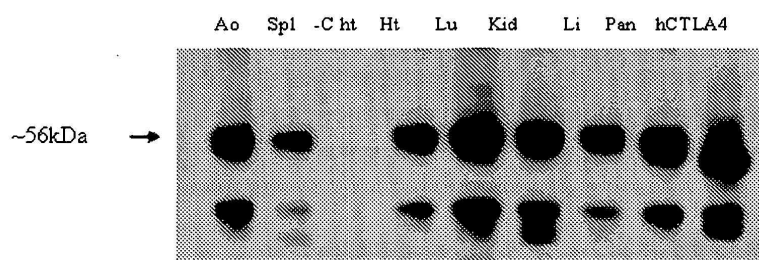


FIGURA 10b

FIGURA 10

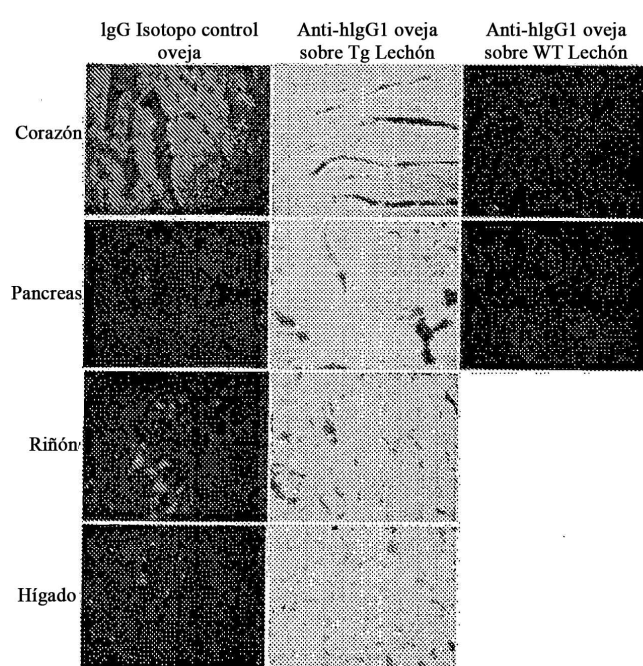


FIGURA 11

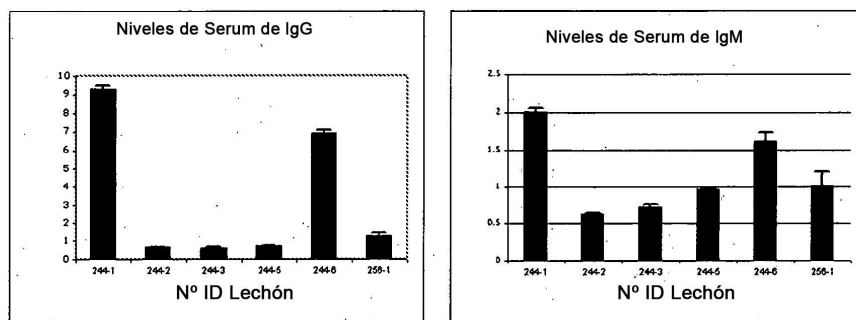


FIGURA 12

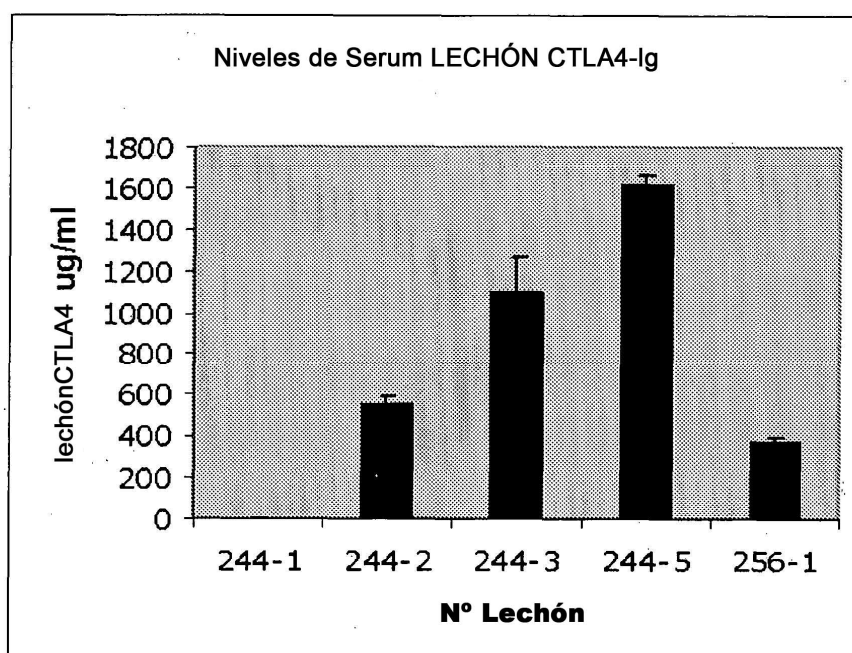


FIGURA 13