

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 737**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2010 E 12171791 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015 EP 2517556**

54 Título: **Método de recombinación específica de sitio, roedores y células de roedores capaces de expresar anticuerpos o cadenas químéricas**

30 Prioridad:

08.07.2009 GB 0911846
08.07.2009 US 223960 P
28.07.2009 GB 0913102
17.06.2010 US 355666 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.01.2016

73 Titular/es:

KYMAB LIMITED (100.0%)
The Bennet Building (B930), Babraham Research
Campus
Cambridge CB22 3AT, GB

72 Inventor/es:

BRADLEY, ALLAN;
LEE, E-CHIANG;
LIANG, QI y
WANG, WEI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 557 737 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de recombinación específica de sitio, roedores y células de roedores capaces de expresar anticuerpos o cadenas quiméricas

Antecedentes

5 La presente invención se refiere, entre otros, a células y animales no humanos que se modifican genéticamente para que contengan ADN exógeno, tal como ADN de gen de inmunoglobulina humana, su uso en medicina y el estudio de la enfermedad, procedimientos para la producción de células y animales no humanos, y anticuerpos y cadenas de anticuerpos producidos por tales animales y derivados de los mismos.

10 Para solventar los problemas de la humanización de los anticuerpos, una serie de compañías empezaron a generar ratones con sistemas inmunitarios humanos. La estrategia utilizada fue genosuprimir los locus de la cadena ligera y de la cadena pesada en las células ES y complementar estas lesiones genéticas con transgenes diseñados para que expresen los genes humanos de las cadenas ligera y pesada. Aunque se podían generar anticuerpos completamente humanos, estos modelos tienen varias limitaciones importantes:

15 (i) El tamaño de los locus de las cadenas pesada y ligera (cada uno de varias Mb) hacía imposible introducir todo el locus en estos modelos. Como resultado, las líneas transgénicas recuperadas tenían un repertorio muy escaso de regiones V, la mayoría de las regiones constantes estaban ausentes y en los transgenes no se incluyeron las regiones potenciadoras importantes distales.

20 (ii) La bajísima eficiencia a la hora de generar las líneas transgénicas con un gran inserto y la complejidad y el tiempo necesarios para cruzar cada una de éstas con las cepas que tienen genosuprimidas las cadenas ligera y pesada y hacerlas de nuevo homocigotas restringió el número de líneas transgénicas que se pudieron analizar en busca de la expresión óptima.

(iii) La afinidad de cada uno de los anticuerpos raramente alcanzaba la que se podía obtener con animales (no transgénicos) intactos.

La patente internacional WO 2007117410 describe construcciones quiméricas para expresar anticuerpos quiméricos.

25 La patente internacional WO 2010039900 describe el bloqueo en las células y mamíferos que tienen un genoma que codifica anticuerpos quiméricos.

La presente invención da a conocer, entre otros, un procedimiento para que los mamíferos no humanos generen anticuerpos que comprenden una región variable de Ig de humano, y además da a conocer modelos de animales no humanos para generar tales anticuerpos.

30 Compendio de la invención.

La invención es como se reivindica en esta memoria.

Figuras

Las figuras 1 a 8 muestran un procedimiento repetitivo para la inserción de una serie de BAC de humano en un locus de Ig de ratón.

35 Las figuras 9 a 18 muestran con más detalle el procedimiento de las figuras 1 a 8 para los locus IgH y κ.

Las figuras 19 y 20 muestran los principios en los que se basa la generación de anticuerpos con ratones quiméricos.

La figura 21 muestra un posible sitio de inserción para el ADN humano en un cromosoma de ratón.

Las figuras 22 a 26 describen un procedimiento repetitivo alternativo para la inserción de una serie de BAC de humano en un locus de Ig de ratón.

40 Las figuras 27 a 29 ilustran un mecanismo para la inversión de la región VDJ del hospedador.

La figura 30 ilustra la demostración preliminar de la inserción de un plásmido mediante la estrategia RMCE.

La figura 31 ilustra la RMCE secuencial: inserción por una zona de integración.

La figura 32 ilustra la confirmación de la inserción satisfactoria por la zona de integración.

La figura 33 ilustra la confirmación por PCR de la curación del extremo 3'.

La figura 34 ilustra la inserción del BAC n.º 1 y el diagnóstico por PCR.

Descripción general

Todas las coordenadas de nucleótidos para el ratón son del NCBI m37, abril de 2007 ENSEMBL versión 55.37h para la cepa C57BL/6J de ratón. Los nucleótidos de humano son de GRCh37, febrero de 2009 ENSEMBL versión 55.37 y los de rata de RGSC 3.4 de diciembre de 2004 ENSEMBL versión 55.34w.

En la presente invención se describen procedimientos para la construcción de locus quiméricos de las cadenas ligera y pesada de humano en un mamífero no humano, por ejemplo un ratón. La referencia al trabajo en ratones en la presente memoria es meramente ilustrativa, y la referencia a ratones se adopta para incluir la referencia a todos los mamíferos no humanos a menos que resulta evidente de otro modo a partir de la descripción, siendo preferidos los ratones como mamíferos no humanos.

Se describe en la presente memoria:

Un mamífero no humano cuyo genoma comprende:

(a) una serie de regiones V de IgH de humano, una o varias regiones D de humano y una o varias regiones J de humano por delante de la región constante del mamífero no humano hospedador; y

(b) opcionalmente, una o varias regiones V de cadena ligera κ de Ig de humano y una o varias regiones J de cadena ligera κ de Ig de humano por delante de la región constante kappa del mamífero no humano hospedador y/o una o varias regiones V de cadena ligera λ de Ig de humano y una o varias regiones J de cadena ligera λ de Ig de humano por delante de la región constante lambda del mamífero no humano hospedador;

en donde el mamífero no humano es capaz de producir un repertorio de anticuerpos quiméricos o cadenas de anticuerpo que tienen una región constante de mamífero no humano y una región variable de humano.

Un mamífero no humano cuyo genoma comprende:

(a) una serie de regiones V de cadena ligera kappa de Ig de humano y una o varias regiones J de cadena ligera kappa de Ig de humano por delante de la región constante kappa del mamífero no humano hospedador y/o una serie de regiones V de cadena ligera lambda de Ig de humano y una o varias regiones J de cadena ligera lambda de Ig de humano por delante de la región constante lambda del mamífero no humano hospedador; y

(b) opcionalmente una o varias regiones V de IgH de humano, una o varias regiones D de humano y una o varias regiones J de humano por delante de la constante del mamífero no humano hospedador;

en donde el mamífero no humano es capaz de producir un repertorio de anticuerpos quiméricos que tienen una región constante de mamífero no humano y una región variable de humano.

Opcionalmente, el genoma del mamífero no humano está modificado para impedir la expresión de los anticuerpos completamente específicos de la especie del hospedador.

En un aspecto, el inserto de ADN humano comprende al menos el 50% de los genes de la parte variable (V) de la cadena pesada de humano, tal como al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% y en un aspecto todos los genes V de humano.

En un aspecto, el inserto de ADN humano comprende al menos el 50% de los genes de diversidad (D) de la cadena pesada de humano, tal como al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% y en un aspecto todos los genes D de humano.

En un aspecto, el inserto de ADN humano comprende al menos el 50% de los genes de unión (J) de la cadena pesada de humano, tal como al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% y en un aspecto todos los genes J de humano.

En un aspecto, el inserto de ADN humano comprende al menos el 50% de los genes de la parte variable (V) de la cadena ligera de humano, tal como al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% y en un aspecto todos los genes V de la cadena ligera de humano.

En un aspecto, el inserto de ADN humano comprende al menos el 50% de los genes de unión (J) de la cadena ligera de humano, tal como al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% y en un aspecto todos los genes J de la cadena ligera de humano.

Los genes de humano que están insertados pueden proceder del mismo individuo o de diferentes individuos, o ser sintéticos o representar secuencias consenso de humano.

Aunque el número de regiones V, D y J varía entre los individuos humanos, en un aspecto se considera que en los humanos hay 51 genes V, 27 genes D y 6 genes J en la cadena pesada, 40 genes V y 5 genes J en la cadena ligera κ y 29 genes V y 4 genes J en la cadena ligera λ (Janeway y Travers, *Immunobiology*, tercera edición).

En un aspecto, el locus de la cadena pesada de humano que se ha insertado en el mamífero no humano contiene el repertorio completo de regiones V, D y J de humano, las cuales están en el genoma en disposición funcional con las regiones constantes del mamífero no humano, de tal forma que los anticuerpos quiméricos funcionales se pueden producir entre las regiones constantes del mamífero no humano y las regiones variables de humano. Todo este material genético insertado de la cadena pesada de humano se denomina en la presente memoria la región VDJ de IgH de humano, y comprende ADN de un genoma humano que codifica todos los exones que codifican las porciones V, D y J de humano y convenientemente también los intrones asociados. De igual forma, la referencia a las regiones V y J de la cadena ligera κ de Ig de humano en la presente memoria hace referencia al ADN humano que comprende todos los exones que codifican las regiones V y J y convenientemente también los intrones asociados del genoma humano. La referencia a las regiones V y J de la cadena ligera λ de Ig de humano en la presente memoria se refiere al ADN humano que comprende todos los exones que codifican las regiones V y J y convenientemente también los intrones asociados del genoma humano.

Las regiones variables de humano están insertadas adecuadamente por delante de la región constante del mamífero no humano, en donde este último comprende todo el ADN necesario para codificar la región constante completa o una porción suficiente de la región constante que permite la formación de un anticuerpo quimérico eficaz que es capaz de reconocer específicamente un antígeno.

En un aspecto, los anticuerpos o cadenas de anticuerpo quiméricos tienen una parte de una región constante del hospedador que es suficiente para proporcionar una o varias funciones efectoras que se observan en los anticuerpos que se sintetizan de forma natural en un mamífero hospedador, por ejemplo son capaces de interactuar con los receptores de Fc, y/o fijarse al complemento.

Por lo tanto, en la presente memoria, la referencia a un anticuerpo o cadena de anticuerpo quimérico que tiene una región constante del hospedador no mamífero no se limita a la región constante completa, sino que también incluye anticuerpos o cadenas quiméricas que tienen toda la región constante del hospedador, o una parte de la misma que basta para proporcionar una o más funciones efectoras. Esto también se aplica a las células mamíferos no humanos y a los procedimientos de la invención en los cuales el ADN de la región variable de humano puede insertarse en el genoma del hospedador de tal manera que forma una cadena de anticuerpo quimérico con toda o parte de una región constante del hospedador. En un aspecto, toda la región constante del hospedador está unida operativamente al ADN de la región variable de humano.

La región constante del mamífero no humano hospedador en la presente memoria es preferiblemente la región constante endógena de tipo silvestre del hospedador que está en el locus de tipo silvestre, como convenga para la cadena ligera o pesada. Por ejemplo, el ADN de la cadena pesada de humano está insertado convenientemente en el cromosoma 12 de ratón, convenientemente adyacente a la región constante de la cadena pesada de ratón.

En un aspecto, la inserción del ADN de humano, tal como la región VDJ de humano, está integrada en la región entre el exón J4 y el locus C μ del locus IgH del genoma de ratón, y en un aspecto está insertado entre las coordenadas 114.667.090 y 114.665.190, convenientemente en la coordenada 114.667.091. En un aspecto, la inserción del ADN de humano, tal como el de VJ de la cadena ligera κ de humano, está integrado en el cromosoma 6 de ratón entre las coordenadas 70.673.899 y 70.675.515, convenientemente en la posición 70.674.734, o una posición equivalente del locus de la cadena λ de ratón en el cromosoma 16.

En un aspecto, la región constante del mamífero no humano hospedador que formará parte del anticuerpo quimérico puede estar en un locus cromosómico diferente (no endógeno). En este caso, el inserto de ADN de humano, tal como la región o regiones variables VDJ o VJ de humano, se pueden insertar entonces en el genoma no humano en un sitio que es diferente del sitio en el que está de forma natural la región constante de las cadenas ligera o pesada. La región constante nativa se puede insertar en el genoma, o duplicar dentro del genoma, en un locus cromosómico diferente al de la posición nativa, de tal forma que se encuentra en una disposición funcional con la región variable de humano de tal forma que aún se pueden producir los anticuerpos quiméricos descritos en esta memoria.

En un aspecto, el ADN de humano se inserta en la región constante endógena de tipo silvestre del hospedador ubicada en el locus de tipo silvestre entre la región constante del hospedador y la región VDJ del hospedador.

La referencia a que la región variable se ubica por delante de la región constante del mamífero no humano significa que las dos porciones de anticuerpo, variable y constante, están localizadas adecuadamente una respecto a otra para permitir que las regiones variable y constante formen un anticuerpo o cadena de anticuerpo quimérico *in vivo* en el mamífero. Así pues, el inserto de ADN de humano y la región constante del hospedador se encuentran en una disposición funcional una respecto a la otra que permite la producción de anticuerpos o cadenas de anticuerpo.

En un aspecto, el inserto de ADN de humano es capaz de expresarse con diferentes regiones constantes del hospedador por medio del cambio de isotipo. En un aspecto, el cambio de isotipo no requiere o no implica el cambio en *trans*. La inserción del ADN de la región variable de humano en el mismo cromosoma que la región constante relevante del hospedador significa que no hay necesidad de cambiar en *trans* para producir el cambio de isotipo.

- 5 Tal y como se explicó más arriba, los locus transgénicos utilizados para los modelos de la técnica anterior fueron de origen humano, por lo tanto incluso en los casos en donde los transgenes eran capaces de complementar el locus de ratón de modo que los ratones produjeran linfocitos B que sintetizaban anticuerpos completamente humanos, la afinidad de cada anticuerpo raramente alcanzó la que se podía obtener en los animales intactos (que no son transgénicos). La razón principal de esto (además del repertorio y los niveles de expresión descritos más arriba) es el hecho de que los elementos de control del locus son humanos. Así pues, están comprometidos los componentes de señalización, por ejemplo para activar la hipermutación y la selección de anticuerpos de alta afinidad.

- 10 Por el contrario, como se describe en esta memoria, se mantienen las regiones constantes del mamífero no humano hospedador y se prefiere que al menos un potenciador del mamífero no humano y otra secuencia de control, tal como una región de cambio, se mantengan en la disposición funcional con la región constante del mamífero no humano, de tal forma que el efecto del potenciador o de otra secuencia de control, tal y como se observa en el mamífero hospedador, se ejerce en todo o en parte del animal transgénico.

- 15 La estrategia anterior está diseñada para permitir la formación de toda la diversidad del locus de humano, para permitir el mismo nivel de expresión elevado que se conseguiría mediante las secuencias de control del mamífero no humano, tales como los potenciadores, y es tal que la señalización en los linfocitos B, por ejemplo el cambio de isotipo mediante los sitios de recombinación para el cambio, seguiría utilizando las secuencias del mamífero no humano.

Un mamífero con un genoma así produciría anticuerpos quiméricos con la región constante del mamífero no humano y la región variable de humano, pero éstos podrían humanizarse con facilidad, por ejemplo, en una etapa de clonación. Además, la eficacia *in vivo* de estos anticuerpos quiméricos podría evaluarse en estos mismos animales.

- 25 En un aspecto, el inserto de la región VDJ de IgH de humano comprende, en la configuración de las células reproductoras, todas las regiones V, D y J y las secuencias interpuestas de un humano.

- En un aspecto, de 800 a 1000 kb de la región VDJ de IgH de humano está insertada en el locus IgH del mamífero no humano y, en un aspecto, está insertado un fragmento de 940, 950 o 960 kb. Convenientemente, esto incluye las bases de 105.400.051 a 106.368.585 del cromosoma 14 humano (todas las coordenadas se refieren a NCBI36 para el genoma humano, versión 54 del ENSEMBL, y NCBI37 para el genoma de ratón, que se refiere a la cepa de ratón C57BL/6J).

- 30 En un aspecto, el fragmento de IgH de humano que está insertado consiste en las bases 105.400.051 a 106.368.585 del cromosoma 14. En un aspecto, el ADN de la cadena pesada de humano que está insertado, tal como el ADN que consiste en las bases 105.400.051 a 106.368.585 del cromosoma 14, está insertado en el cromosoma 12 de ratón entre el extremo de la región J4 de ratón y la región E μ , convenientemente entre las coordenadas 114.667.091 y 114.665.190, convenientemente en la coordenada 114.667.091.

En un aspecto, la región VJ de la cadena κ de humano que está insertada comprende, en la configuración de las células reproductoras, todas las regiones V y J y las secuencias interpuestas de un humano.

- 40 Convenientemente, esto incluye las bases 88.940.356 a 89.857.000 del cromosoma 2 humano, convenientemente de aproximadamente 917 kb. En otro aspecto, el inserto VJ de la cadena ligera puede comprender sólo los agrupamientos proximales de los segmentos V y de los segmentos J. Tal inserto tendría aproximadamente 473 kb.

En un aspecto, el ADN de la cadena ligera κ de humano, tal como el fragmento de IgK de humano de las bases 88.940.356 a 89.857.000 del cromosoma 2 humano, está convenientemente insertado en el cromosoma 6 de ratón entre las coordenadas 70.673.899 y 70.675.515, convenientemente en la posición 70.674.734.

- 45 En un aspecto, la región VJ de la cadena λ de humano comprende, en la configuración de las células reproductoras, todas las regiones V y J y las secuencias interpuestas de un humano.

Convenientemente, esto incluye las bases análogas a las seleccionadas para el fragmento κ del cromosoma 2 humano.

- 50 Todos los fragmentos específicos de humano descritos más arriba pueden variar de longitud y pueden, por ejemplo, ser más largos o más cortos de lo que se ha definido más arriba, tal como 500 bases, 1 kb, 2 k, 3 k, 4 k, 5 kb, 10 kb, 20 kb, 30 kb, 40 kb o 50 kb o más, que convenientemente comprenden toda o parte de la región V(D)J de humano, mientras que retienen preferiblemente el requisito de que el inserto final comprende el material genético de humano que codifica toda la región de la cadena pesada y toda la región de la cadena ligera, cuando sea apropiado, como

está descrito más arriba.

En un aspecto, el extremo 5' del inserto de humano descrito más arriba tiene más longitud. Cuando se genera el inserto por etapas, entonces el incremento de longitud se produce generalmente en la parte delantera del clon (en 5').

- 5 En un aspecto, el extremo 3' del último gen de humano insertado, por lo general el último gen J de humano que se inserta, tiene menos de 2 kb, preferiblemente menos de 1 kb, desde la región de unión entre humano y ratón.

En un aspecto, el mamífero no humano comprende parte o toda la región VJ de la cadena ligera κ de humano como se describe en la presente memoria, pero no la región VJ de la cadena ligera λ de humano.

- 10 En otro aspecto, el genoma comprende una inserción de los genes de V, D (sólo de la cadena pesada) y J tal y como se describe en la presente memoria en el locus de la cadena pesada y en un locus de cadena ligera, o en el locus de la cadena pesada y en ambos locus de las cadenas ligeras. Preferiblemente, el genoma es homocigoto en uno, o ambos, o los tres locus.

- 15 En otro aspecto, el genoma puede ser heterocigoto en uno o varios de los locus, tal como heterocigoto para el ADN que codifica una cadena de anticuerpo quimérico y una cadena de anticuerpo nativo (de la célula hospedadora). En un aspecto, el genoma puede ser heterocigoto para el ADN capaz de codificar 2 cadenas de anticuerpo diferentes descritas en esta memoria, por ejemplo, comprender 2 cadenas pesadas quiméricas diferentes o 2 cadenas ligeras quiméricas diferentes.

- 20 En esta memoria se describe una célula o mamífero no humano y procedimientos para producir dicha célula o mamífero, tal y como está descrito en la presente memoria, en donde el inserto de ADN de humano, tal como la región VDJ de la IgH y/o las regiones V y J de la cadena ligera, ambas de humano, se encuentran en sólo un alelo y no en ambos alelos del mamífero o de la célula. En este aspecto, un mamífero o célula tiene el potencial de expresar una cadena ligera o pesada de anticuerpo endógena de hospedador y una cadena ligera o pesada quimérica.

- 25 En otro aspecto de la invención, la región VDJ, o la región VJ de la cadena ligera, ambas de humano, no se utiliza en su totalidad, sino que se pueden utilizar partes de la región VDJ o VJ de humano equivalente, tal como los exones, de otras especies, tal como uno o varios de los exones V, D o J de otras especies, o secuencias reguladoras de otras especies. En un aspecto, las secuencias utilizadas en lugar de las secuencias humanas son ni de humano ni de ratón. En un aspecto, las secuencias utilizadas pueden ser de roedor o de primate, tal como un chimpancé. Por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más o todas las regiones J de un primate que no sea un humano pueden utilizarse para reemplazar 1, 2, 3, 4 o más de los exones J humanos en la región VDJ/VJ de las células y animales de la invención.
- 30

En otro aspecto, el inserto de ADN de humano, tal como la región VDJ de IgH, y/o las regiones VJ de la cadena ligera, de humano se pueden insertar de tal forma que estén unidas operativamente en el genoma con una región constante μ procedente de una especie que no es ratón, que no es humano, tal como una secuencia de roedor o primate, tal como una secuencia de rata.

- 35 Otras especies que no sean humanas ni murinas, de las cuales se pueden utilizar los elementos del ADN en la presente invención, incluyen conejos, llamas, dromedarios, alpacas, camellos y tiburones.

En un aspecto, el inserto de ADN de humano, tal como la región VDJ o VJ de humano, no está unido operativamente a la secuencia μ endógena del hospedador, sino más bien a la secuencia μ que no es del hospedador.

- 40 La unión operativa permite convenientemente la producción de un anticuerpo cuya cadena ligera o pesada comprende la región variable de humano.

- 45 En un aspecto, el inserto de ADN de humano, tal como la región VDJ de IgH (y/o las regiones VJ de la cadena ligera) de humano se pueden insertar en el cromosoma hospedador junto con el ácido nucleico de la región constante μ que no es el ácido nucleico de la región constante μ del hospedador y, preferiblemente, es una región constante μ de una especie que no es humana y ni de ratón. Convenientemente, el inserto de ADN de humano, tal como la región VDJ (y/o las regiones VJ de la cadena ligera) de humano se une operativamente a una μ que no es humana ni es de ratón, y es capaz de formar una cadena quimérica ligera o pesada de anticuerpo. En otro aspecto se puede insertar una μ que no es humana ni es de ratón en el cromosoma del hospedador en un elemento genético separado al de la región variable de humano, en una localización diferente en el genoma, convenientemente unido operativamente a la región variable de tal forma que se puede formar una cadena quimérica ligera o pesada de anticuerpo.
- 50

En un aspecto, la invención se refiere a una célula, o un mamífero no humano, cuyo genoma comprende: una o varias regiones V de la cadena ligera κ de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera κ de Ig de

humano por delante de toda o parte de la región constante de la κ de humano.

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula, o mamífero no humano, cuyo genoma comprende: una o varias regiones V de la cadena ligera λ de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera λ de Ig de humano por delante de toda o parte de la región constante de la λ de humano.

- 5 Convenientemente, las regiones VJ y C de la cadena ligera pueden formar cadenas de anticuerpo *in vivo* capaces de reaccionar específicamente contra un antígeno.

En un aspecto de la invención hay una secuencia codificante no humana en el inserto de la región de la cadena ligera.

- 10 En tales aspectos, una región κ y/o λ de humano se inserta en el genoma, en combinación con la inserción de la región VDJ de la cadena pesada o parte de la misma, por delante de la región constante de la cadena pesada del hospedador tal y como se describe en la presente memoria.

Así pues, la célula o mamífero no humano descritos en la presente memoria pueden comprender:

- (a) una serie de regiones V de IgH de humano, una o varias regiones D de humano y una o varias regiones J de humano por delante de la región constante del mamífero no humano hospedador; y
- 15 (b) una o varias regiones V de la cadena ligera κ de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera κ de Ig de humano por delante de toda o parte de la región constante de la κ no humana,

en donde el mamífero no humano es capaz de producir un repertorio de anticuerpos que tienen una cadena de anticuerpo que comprende la región constante del mamífero no humano y una región variable de humano.

La célula o mamífero no humano descritos en la presente memoria pueden comprender

- 20 (a) una serie de regiones V de IgH de humano, una o varias regiones D de humano y una o varias regiones J de humano por delante de la región constante del mamífero no humano hospedador; y
- (b) una o varias regiones V de la cadena ligera λ de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera λ de Ig de humano por delante de la región constante de la λ del mamífero no humano hospedador;

- 25 en donde el mamífero no humano es capaz de producir un repertorio de anticuerpos que tienen una cadena de anticuerpo que comprende una región constante del mamífero no humano y una región variable de humano.

- Convenientemente, la inserción del ADN de la VJC de la cadena ligera de humano, o una parte de la misma como está descrito más arriba, se realiza en el locus equivalente de ratón. En un aspecto, el ADN de VJC de la cadena ligera κ de humano, o una parte del mismo, está insertado inmediatamente por delante o por detrás de la región VJC de la κ de ratón. En un aspecto, la región VJC de la cadena ligera λ de humano o una parte de la misma se inserta
- 30 inmediatamente por delante o por detrás de la región VJC de la λ de ratón. En un aspecto, sólo se inserta el locus de VJC de la κ de humano. Las inserciones pueden realizarse con las técnicas descritas en la presente memoria y convenientemente no retiran del genoma las secuencias del hospedador. En un aspecto, las secuencias de VJC del mamífero no humano hospedador pueden inactivarse de algún modo, por mutación o inversión, o por inserción del ADN de la región variable de humano, o por otros medios. En un aspecto, la célula o mamífero no humano de la
- 35 invención puede comprender una inserción de la región VJC completa de humano.

El ADN de la región variable de la κ de humano podría estar insertado en el genoma en una disposición funcional con una región constante de la λ , por ejemplo, estar insertado por delante de una región constante de la λ . Alternativamente, el ADN de la región variable de la λ de humano podría estar insertado en una disposición funcional con una región constante de la κ , por ejemplo, estar insertado por delante de una región constante de la κ .

- 40 En un aspecto, una o varias de las secuencias de control del mamífero no humano, tal como la secuencia o secuencias potenciadoras, se mantienen por delante de la región constante de μ del mamífero no humano, convenientemente en su posición nativa con respecto a la distancia que la separa de la región constante.

- En un aspecto, una o varias secuencias de control del mamífero no humano, tal como una secuencia o secuencias potenciadoras, se mantienen por detrás de la región constante de μ del mamífero no humano, convenientemente en su posición nativa con respecto a la distancia que la separa de la región constante.
- 45

En un aspecto, una secuencia de cambio del mamífero no humano, convenientemente la secuencia de cambio endógena, se mantiene por delante de la región constante de μ del mamífero no humano, convenientemente en su posición nativa con respecto a la distancia que la separa de la región constante.

En tal localización, las secuencias de cambio o potenciadoras del hospedador están operativas *in vivo* con las

secuencia o secuencias de la región constante del hospedador.

En un aspecto, una secuencia de cambio no es ni humana ni nativa en el mamífero no humano, por ejemplo en un aspecto una secuencia de cambio de un mamífero no humano, no es una secuencia de cambio de ratón ni humana. La secuencia de cambio puede ser, por ejemplo, una secuencia de roedor o de primate, o una secuencia sintética. En particular, la secuencia de cambio puede ser una secuencia de rata, donde el mamífero no humano es un ratón. A modo de ejemplo, una secuencia de la parte constante de la cadena μ de humano o de ratón puede colocarse bajo el control de una secuencia de cambio de una rata o de un chimpancé u otra secuencia de cambio, convenientemente capaz de permitir que se produzca *in vivo* el cambio de isotipo.

La célula o mamífero de la invención puede, por lo tanto, comprender una secuencia de cambio de mamífero humano o no humano y una región o regiones potenciadoras de mamífero humano o no humano. Pueden estar por delante de una región constante de mamífero humano o no humano. Preferiblemente, las secuencias de control son capaces de dirigir la expresión, o cuanto menos controlar, la producción de los anticuerpos que comprenden una región constante con la que se asocian. Una combinación contemplada es un cambio de rata con secuencias potenciadoras de ratón y regiones constantes de ratón en una célula de ratón.

En la presente memoria se describe una célula, preferiblemente una célula no humana, o mamífero no humano, que comprende un locus de cadena ligera o de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene ADN de 3 o más especies. Por ejemplo, la célula o animal puede comprender ADN de la región constante de la célula hospedadora, una o varias secuencias codificantes de V, D o J de humano y una o varias regiones de ADN que no son ni humanas ni del hospedador que son capaces de controlar una región del locus de la inmunoglobulina, tal como una secuencia de cambio, promotor o potenciador que es capaz de controlar la expresión o el cambio del isotipo *in vivo* del ADN de la Ig. En un aspecto, la célula o animal es un ratón y comprende adicionalmente ADN humano del locus de Ig de humano y adicionalmente una secuencia de ADN que no es de ratón, tal como una secuencia de ADN de rata, capaz de regular el ADN humano o de ratón.

En la presente memoria se describe una célula, preferiblemente una célula no humana, o mamífero no humano, que comprende un locus de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina que tiene ADN de 2 o más genomas humanos diferentes. Por ejemplo, podría comprender secuencias V(D)J de la cadena pesada de más de un genoma humano dentro de una cadena ligera o pesada, o ADN de VDJ de la cadena pesada de un genoma y secuencias VJ de la cadena ligera de un genoma diferente.

En la presente memoria se describe un fragmento de ADN o célula o mamífero no humano que comprende un locus de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina, o parte de la misma, que tiene ADN de 2 o más especies, donde una especie contribuye con una región no codificante tal como una región reguladora, y la otra especie codifica regiones tales como las regiones V, D, J o constantes.

En un aspecto, el promotor humano y/o los otros elementos de control que están asociados a las diferentes regiones V, D o J de humano se mantienen en el genoma de ratón.

En otro aspecto, uno o varios de los elementos promotores, u otros elementos de control, de las regiones de humano, tal como las regiones V de humano, están optimizados para interaccionar con la maquinaria transcripcional de un mamífero no humano.

Convenientemente, una secuencia codificante de humano puede estar colocada bajo el control de un promotor adecuado de mamífero no humano, lo que permite que el ADN humano se transcriba con eficacia en la célula animal no humana adecuada. En un aspecto, la región de humano es una secuencia que codifica la región V de humano, y la región V de humano se coloca bajo el control de un promotor del mamífero no humano.

El reemplazo funcional del promotor o de otras regiones de control de humano por el promotor o por las regiones de control del mamífero no humano puede llevarse a cabo mediante el uso de ingeniería de recombinación, u otras tecnologías de ADN recombinante, para insertar una parte de la región de Ig de humano (tal como una región V de humano) en un vector (tal como BAC) que contiene una región de Ig no humana. La técnica recombinante/ingeniería de recombinación reemplaza convenientemente una porción del ADN no humano (p. ej. ratón) con la región de Ig de humano y, por lo tanto, coloca la región de Ig de humano bajo el control del promotor o de otra región de control del mamífero no humano. Convenientemente, la región codificante de humano de una región V de humano reemplaza una secuencia codificante de la región V de ratón. Convenientemente, la región codificante de humano de una región D de humano reemplaza una secuencia codificante de la región D de ratón. Convenientemente, la región codificante de humano de una región J de humano reemplaza una secuencia codificante de la región J de ratón. De este modo, las regiones V, D o J de humano pueden colocarse bajo el control de un promotor de mamífero no humano, tal como un promotor de ratón.

En un aspecto, el único inserto de ADN de humano en el animal o la célula de mamífero no humano son las regiones codificantes de V, D o J, y éstas se colocan bajo el control de las secuencias reguladoras del hospedador u otras

secuencias (que no son humanas ni son del hospedador). En un aspecto, la referencia a regiones codificantes de humano incluye tanto intrones como exones de humano o, en otro aspecto, simplemente exones sin intrones, que puede ser en forma de ADNc.

5 Alternativamente, es posible utilizar la ingeniería de recombinación, u otras tecnologías de ADN recombinante, para insertar un promotor u otra región de control de mamífero no humano (p. ej., ratón), tal como un promotor para una región V, en un BAC que contiene una región de Ig de humano. A continuación, la etapa de ingeniería de recombinación coloca una porción del ADN de humano bajo el control del promotor u otra región de control de ratón.

10 Las estrategias descritas en la presente memoria también pueden utilizarse para insertar parte de las regiones V, D y J, o todas ellas, de la cadena pesada de humano por delante de una región constante de la cadena ligera, en vez de por delante de la región constante de la cadena pesada. Asimismo, parte o todas las regiones V y J de la cadena ligera de humano se pueden insertar por delante de la región constante de la cadena pesada. La inserción puede estar en el locus de la región constante endógena, por ejemplo, entre las regiones J y constante endógena, y puede ser solamente de parte, o de todos, los genes de V, D o J, descartando el promotor o las secuencias potenciadoras, o puede ser de parte, o de todos, los genes de V, D o J con uno o varios de todos los promotores o secuencias potenciadoras correspondientes. En un aspecto, el repertorio completo de fragmentos de V, D o J en la orientación en que están en las células reproductoras puede insertarse por delante de una región constante del hospedador y en disposición funcional con ella.

15 Así pues, la presente invención permite la inserción de regiones V y/o D y/o J de un humano, o de cualquier especie, en un cromosoma de una célula de diferentes especies que comprende una región constante, lo que permite expresar una cadena quimérica de anticuerpo.

20 En esta memoria se describe la inserción de parte del ADN de la región variable de humano en el genoma de un mamífero no humano en disposición operativa con parte, o toda, la región constante de la cadena pesada de humano en la región del locus de la región constante de la cadena pesada endógena, de tal forma que pueda producirse una cadena de anticuerpo. En este aspecto de la invención y cuando está además insertado el ADN de la cadena ligera de humano, la inserción del ADN de la cadena ligera puede ser en forma de una construcción completamente humana, que tiene ADN de la región variable de humano y ADN de la región constante de humano, o tiene ADN de la región variable de humano y ADN de la región constante de una especie no humana que no es la hospedadora. También se pueden llevar a cabo otras variaciones, tales como la inserción tanto de la región variable de la cadena ligera de humano como de la región constante del genoma del hospedador. Además, la inserción de dichos transgenes de la cadena ligera necesitan no estar en el locus endógeno equivalente, sino que podría estar en cualquier otro lugar del genoma. En tal escenario, la célula o mamífero podría producir cadenas pesadas quiméricas (que comprenden ADN de la región variable de humano y ADN de la región constante de ratón) y cadenas ligeras que comprenden ADN de la región constante de humano y de la variable de humano. Así pues, en un aspecto de la invención, el ADN de la región variable de λ y/o κ de humano puede estar insertado por delante del locus endógeno, o por detrás, o realmente en un cromosoma diferente al del locus endógeno, y estar insertado con o sin el ADN de la región constante.

35 Al igual que la inserción del ADN de la cadena ligera de humano por delante de la región constante del mamífero no humano hospedador, otro aspecto de la invención se refiere a la inserción de una o ambas regiones variables de las cadenas ligeras de humano por detrás de la región constante del locus endógeno, o en cualquier otro lugar del genoma.

40 Por lo general, se prefiere la inserción del ADN de la región variable de humano en, o cerca de él, el locus endógeno equivalente en el genoma receptor, por ejemplo, a menos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 kb del borde (delantero o trasero) de un locus de inmunoglobulina del hospedador.

En la presente memoria se describe una célula o mamífero no humano, cuyo genoma comprende:

45 (a) una serie de regiones V de IgH de humano, una o varias regiones D de humano y una o varias regiones J de humano por delante de la región constante del mamífero no humano hospedador; y

(b) una o varias regiones V de la cadena ligera κ de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera κ de Ig de humano; y/o una o varias regiones V de la cadena ligera λ de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera λ de Ig de humano;

50 en donde el mamífero no humano es capaz de producir un repertorio de anticuerpos quiméricos, o cadenas ligeras o pesadas quiméricas, que tienen una región constante del mamífero no humano y una región variable de humano.

En un aspecto particular, el genoma de la célula o mamífero no humano comprende:

una serie de regiones V de IgH de humano, una o varias regiones D de humano y una o varias regiones J de humano por delante de la región constante del mamífero no humano hospedador;

una o varias regiones V de la cadena ligera κ de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera κ de Ig de humano por delante de la región constante de la κ del mamífero no humano hospedador; y

una o varias regiones V de la cadena ligera λ de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera λ de Ig de humano por detrás de la región constante de la λ del mamífero no humano hospedador,

- 5 opcionalmente en las que la región variable de la λ de humano puede estar insertada por detrás del locus endógeno de la λ del hospedador en unión operativa con una región constante de la λ de humano, de tal forma que la célula o el mamífero no humano pueden producir cadenas ligeras de anticuerpo completamente humanas y cadenas pesadas quiméricas.

10 En otro aspecto diferente de la invención, el uso de los procedimientos de la invención permite construir un locus por etapas mediante inserciones secuenciales y por lo tanto garantiza la inserción del ADN de la región variable de humano junto con el ADN de la región constante de humano o de no humano en cualquier posición adecuada del genoma de una célula hospedadora no humana. Por ejemplo, los procedimientos de la invención se pueden utilizar para insertar ADN de la región variable de inmunoglobulina de humano junto con ADN de la región constante del genoma del hospedador en cualquier lugar del genoma de una célula hospedadora no humana, lo que permite
15 producir una cadena de anticuerpo quimérica desde un sitio diferente al de la región pesada endógena. Cualquier construcción de ADN de la cadenas ligera o de la cadena pesada de humano contemplada más arriba se puede insertar en cualquier posición deseada del genoma de una célula hospedadora no humana mediante las técnicas descritas en la presente memoria. Así, la presente invención también se refiere a células y mamíferos que tienen genomas que comprenden tales inserciones.

20 En la presente memoria se describe un vector, tal como un vector BAC, que comprende una región V, D o J de humano en una disposición funcional con un promotor, u otra secuencia de control, de mamífero no humano de tal forma que la expresión de la región V, D o J de humano se encuentra controlada por el promotor de mamífero no humano en una célula del mamífero no humano, tal como una célula ES, en particular una vez insertado en el genoma de dicha célula.

25 En la presente memoria se describen células y mamíferos no humanos que contienen dichas células, en donde dichas células o mamíferos tienen una región V, D o J de humano en una disposición funcional con un promotor de mamífero no humano, u otra secuencia de control, de tal forma que la expresión de la región V, D o J de humano está controlada por el promotor del mamífero no humano en las células o en el mamífero.

30 Así, generalmente, un aspecto de la invención se refiere a una célula hospedadora de mamífero no humano capaz de expresar la secuencia codificante de V, D o J de humano bajo el control de un promotor o región de control del hospedador, en donde la expresión es capaz de producir un anticuerpo humanizado que tiene un dominio variable humano y una región constante del mamífero no humano.

En la presente memoria se describe una célula, tal como una célula de no mamífero, tal como una célula ES, cuyo genoma comprende:

- 35 (a) una serie de regiones V de IgH de humano, una o varias regiones D de humano y una o varias regiones J de humano por delante de la región constante del mamífero no humano hospedador; y

40 (b) opcionalmente, una o varias regiones V de cadena ligera κ de Ig de humano y una o varias regiones J de cadena ligera κ de Ig de humano por delante de la región constante kappa del mamífero no humano hospedador y/o una o varias regiones V de cadena ligera λ de Ig de humano y una o varias regiones J de cadena ligera λ de Ig de humano por delante de la región constante λ del mamífero no humano hospedador;

En la presente memoria se describe una célula, tal como una célula de mamífero no humano, tal como una célula ES, cuyo genoma comprende:

45 (a) una serie de regiones V de cadena ligera kappa de Ig de humano y una o varias regiones J de cadena ligera kappa de Ig de humano por delante de la región constante kappa del mamífero no humano hospedador y/o una serie de regiones V de cadena ligera λ de Ig de humano y una o varias regiones J de cadena ligera λ de Ig de humano por delante de la región constante λ del mamífero no humano hospedador; y

 (b) opcionalmente una o varias regiones V de IgH de humano, una o varias regiones D de humano y una o varias regiones J de humano por delante de la constante del mamífero no humano hospedador.

50 En un aspecto, la célula es una célula ES capaz de desarrollarse en un mamífero no humano capaz de producir un repertorio de anticuerpos que son quiméricos, en donde dichos anticuerpos quiméricos tienen una región constante de mamífero no humano y una región variable de humano. Opcionalmente, el genoma de la célula está modificado para impedir la expresión de anticuerpos completamente específicos de la especie hospedadora.

En un aspecto, la célula es una célula madre pluripotente inducida (célula iPS, por su nombre en inglés).

En un aspecto, las células son células de mamífero no humano aisladas.

En un aspecto, una célula como la que se describe en la presente memoria es preferiblemente una célula de mamífero no humano.

- 5 En esta memoria se describe una línea celular que crece, o que cuanto menos procede, de las células como las descritas en la presente memoria, que incluye una línea celular inmortalizada. La línea celular puede comprender genes de V, D o J humanos insertados tal y como se describe en la presente memoria, bien en la configuración que tienen en las células reproductoras o después de la reorganización tras la maduración *in vivo*. La célula se puede
- 10 inmortalizar mediante la fusión a una célula tumoral para proporcionar una célula o línea celular productora de anticuerpos, o se puede realizar mediante inmortalización celular directa.

En esta memoria se describen vectores para utilizar en la invención. En un aspecto tales vectores son BAC (cromosomas artificiales bacterianos, en inglés "bacterial artificial chromosomes"). Se apreciará que en la invención se pueden emplear otros vectores de clonación, y por lo tanto, en esta memoria, cuando se hace referencia a los BAC, se debe entender que se hace referencia en general a cualquier vector adecuado.

- 15 En un aspecto, los BAC utilizados para la generación del ADN de humano a insertar, tal como las regiones VDJ o VJ, están recortados, de tal forma que no se duplica ni se pierde ninguna secuencia final de la región VJ o VDJ de humano, ni ninguna parte de la misma, en el mamífero no humano cuando se compara con la secuencia genómica humana original.

- 20 En la presente memoria se describe un vector que comprende un inserto, preferiblemente que comprende una región de ADN de humano de alguno de los locus VDJ o VJ de humano, flanqueado por ADN que no es de ese locus. El ADN flanqueante puede comprender uno o varios marcadores de selección o uno o varios sitios de recombinación específica de sitio. En un aspecto, el vector comprende 2 o más, tal como 3, sitios de recombinación específica de sitio incompatibles y heteroespecíficos. En un aspecto, los sitios de recombinación específica de sitio pueden ser sitios loxP, o variantes de los mismos, o sitios FRT o variantes de los mismos. En un aspecto, el vector
- 25 comprende una o varias secuencias ITR (repetición terminal invertida) de transposones.

- En un aspecto, los animales no humanos descritos en la presente memoria no producen convenientemente ningún anticuerpo completamente humanizado. En un aspecto, esto es porque no hay insertado ADN de la región constante de humano. Alternativamente, no hay ningún ADN de la región constante de humano en el genoma capaz de formar un anticuerpo junto con el componente insertado de ADN de la región variable de humano, por ejemplo, debido a
- 30 alguna mutación dentro de algún ADN de la región constante de humano, o a la distancia entre el ADN de la región constante de humano y el ADN de la región variable de humano.

- En un aspecto, el ADN de la región constante de la cadena ligera de humano puede estar incluido en el genoma de la célula, de tal forma que podría generarse una cadena de anticuerpo humano con λ o κ completamente humana, pero ésta sólo podría formar un anticuerpo con una cadena pesada quimérica y no produciría un anticuerpo completamente humano con las regiones constante y variable de humanos.
- 35

- En un aspecto, el genoma del mamífero no humano está modificado para impedir la expresión de los anticuerpos completamente específicos de la especie hospedadora. Los anticuerpos completamente específicos de la especie hospedadora son anticuerpos que tienen regiones constantes y variables del organismo hospedador. En este contexto, la terminología «específico» no pretende referirse a la fijación de los anticuerpos producidos por las células o animales de la invención, sino más bien al origen del ADN que codifica estos anticuerpos.
- 40

- En un aspecto, el genoma del mamífero no humano está modificado para impedir la expresión de los anticuerpos nativos (completamente específicos de la especie hospedadora) en el mamífero mediante la inactivación de todo o parte del locus de Ig del mamífero no humano hospedador. En un aspecto, esto se consigue mediante la inversión de toda o parte de la región VDJ, o de la región VJ, del mamífero no humano, opcionalmente mediante la inserción en el genoma de uno o varios sitios para la recombinasa específica de sitio y, entonces, utilizar estos sitios para la escisión o la inversión, mediada por la recombinasa, de todo o parte del locus de Ig del mamífero no humano. En un aspecto se puede emplear una inversión doble, la primera para retirar las V(D)J del locus endógeno y, luego, una inversión más local que las pone en la orientación correcta. En un aspecto se utiliza un único sitio loxP para invertir la región VDJ del mamífero no humano en un locus centromérico o en un locus telomérico.
- 45

- 50 En un aspecto el genoma de mamífero no humano en el cual se inserta el ADN humano comprende regiones V, (D) y J endógenas, y las secuencias endógenas no se han eliminado.

La invención comprende un procedimiento para la inserción de varios fragmentos de ADN en una diana de ADN, convenientemente para formar una inserción contigua en la cual los fragmentos insertados quedan unidos directamente sin secuencias interpuestas. El procedimiento es especialmente aplicable a la inserción de un

fragmento grande de ADN en un cromosoma del hospedador que se puede llevar a cabo por etapas.

En un aspecto, el procedimiento comprende la inserción de una primera secuencia de ADN en una diana, en donde la secuencia tiene una porción de ADN de vector y una primera secuencia de interés (X1); la inserción de una segunda secuencia de ADN en la porción del vector de la primera secuencia, en donde la segunda secuencia de ADN tiene una segunda secuencia de interés (X2) y una segunda porción de vector; y luego se escinde todo el ADN con secuencia de vector que separa X1 y X2 para proporcionar una secuencia X1X2 contigua, o X2X1, dentro de la diana. Opcionalmente, hay una inserción de una o varias secuencias de ADN, en donde cada secuencia de ADN tiene otra secuencia más de interés (X3, ...) y otra porción más de vector, en la porción del vector de la secuencia de ADN precedente, para construir un fragmento de ADN contiguo en la diana.

La diana de ADN para la inserción de la primera secuencia de ADN puede ser un sitio específico o cualquier punto del genoma de una célula determinada.

En la presente memoria se describe el procedimiento general en relación con la inserción de elementos de la región VDJ de humano, pero es aplicable a la inserción de cualquier región de ADN, de cualquier organismo, y en particular la inserción de fragmentos grandes de ADN de > 100 kb, tal como de 100 a 250 kb, o incluso más grandes, tal como la de TCR o HLA. Las peculiaridades y las estrategias descritas en la presente memoria con respecto a la inserción de VDJ pueden aplicarse igualmente a cualquiera de los procedimientos descritos.

En un aspecto, el ADN insertado es ADN de humano, tal como la región VDJ o VJ de humano, se construye en el genoma de una célula, tal como una célula ES, por etapas utilizando 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 o más inserciones independientes para cada región de las cadenas ligera o pesada. Los fragmentos se insertan convenientemente en el mismo, o sustancialmente el mismo, locus celular, p. ej., locus de las células ES, uno tras otro, para formar la región VDJ o VJ completa, o parte de la misma. La presente invención también se refiere a células y animales no humanos que comprenden intermedios en el proceso cuyos genomas pueden comprender sólo una región VDJ parcial, tal como sólo el ADN de la región variable de humano.

En otro aspecto, el procedimiento para producir un mamífero no humano transgénico comprende la inserción de regiones VDJ o VJ de humano por delante de la región constante del mamífero no humano hospedador mediante la inserción por etapas de varios fragmentos por recombinación homóloga, preferiblemente mediante un proceso repetitivo. Convenientemente, se insertan fragmentos de aproximadamente 100 kb de los locus VDJ y VJ humanos, convenientemente para formar parte, o toda, la región VDJ o VJ después de la última repetición del proceso de inserción, tal y como se describe en la presente memoria.

El proceso de inserción comienza en un sitio en el cual se ha insertado un casete de iniciación en el genoma de una célula, tal como una célula ES, lo que proporciona una única región de integración. En un aspecto, el casete de iniciación se inserta en el locus de la cadena pesada del mamífero no humano, para usarlo en la inserción del ADN de la cadena pesada de humano. De igual forma se inserta un casete de iniciación en el locus de la cadena ligera del mamífero no humano, para usarlo en la inserción del ADN de VJ de la cadena ligera de humano. El casete de iniciación comprende convenientemente una secuencia del esqueleto del vector con la cual un vector que contiene un fragmento de ADN humano en la misma secuencia del esqueleto puede recombinarse para insertar el ADN de humano en el genoma de la célula (p. ej., célula ES), y convenientemente, un marcador de selección, tal como un marcador de selección negativa. Convenientemente, la secuencia del esqueleto del vector es la de una genoteca en BAC, para permitir utilizar los BAC en la construcción de las células ES y de los mamíferos. Sin embargo, la secuencia del esqueleto del vector puede ser cualquier secuencia que sirva como un sitio de reconocimiento en el cual puede insertarse una secuencia homóloga, por ejemplo, mediante recombinación homóloga y RMCE, y es preferiblemente un ADN que no codifica ninguna región ni constante ni VDJ.

En un aspecto, la inserción del primer fragmento de ADN en un casete de iniciación va seguido de la inserción de un segundo fragmento de ADN en una porción del primer fragmento de ADN, convenientemente una parte del esqueleto del vector del segundo fragmento de ADN. En un aspecto, un fragmento de ADN insertado comprende una parte de la región VDJ de humano flanqueada por secuencias en 5' y/o 3' que no son de la región VDJ de humano. En un aspecto, las secuencias flanqueadoras en 5' y/o 3' pueden contener cada una uno o varios marcadores de selección, o bien ser capaces de crear un sistema de selección una vez insertadas en el genoma. En un aspecto, una o ambas secuencias flanqueadoras se pueden retirar del genoma *in vitro*, o *in vivo*, después de la inserción. En un aspecto, el procedimiento comprende la inserción de un fragmento de ADN seguido de la selección de ambos extremos 5' y 3' del fragmento insertado que flanquea el ADN de VDJ de humano. En un aspecto, la inserción repetitiva se realiza mediante la inserción de fragmentos de ADN en el extremo 5' del fragmento insertado previamente y, en este aspecto, puede haber delección *in vivo* del ADN del vector que separa las secuencias insertadas del ADN de humano para proporcionar una secuencia contigua de ADN de humano.

En un aspecto, la inserción del ADN de VDJ de humano en un genoma puede lograrse sin dejar ningún ADN flanqueador en el genoma, por ejemplo, mediante la escisión de ADN mediada por transposasa. Una transposasa adecuada es la transposasa del PiggyBac.

- En un aspecto, el primer fragmento de la región variable de humano se inserta mediante recombinación homóloga en la secuencia del esqueleto del casete de iniciación y, luego, el ADN de todo marcador de selección negativo y casete de iniciación se retiran posteriormente por recombinación entre las secuencias diana de la recombinasa, tal como la FRT que se utiliza en este ejemplo, la expresión de FLPasa. Por lo general, la repetición de las inserciones en la diana de la secuencia de inicio del esqueleto (p. ej. BAC) y la posterior retirada mediante reorganización entre las secuencias diana de la recombinasa se repiten para reconstruir toda la región VDJ de humano por delante de la región constante del no mamífero hospedador.
- En un aspecto, en el procedimiento puede utilizarse un marcador o sistema de selección. El marcador puede generarse durante la inserción de un fragmento de ADN en un genoma, por ejemplo, al formar un marcador de selección junto con un elemento de ADN ya presente en el genoma.
- En un aspecto, el genoma de la célula (p. ej., célula ES) no contiene 2 marcadores de selección idénticos al mismo tiempo durante el proceso. Se puede observar que el proceso repetitivo de inserción y selección puede llevarse a cabo con 2 marcadores de selección diferentes, como se describe en los ejemplos de la presente memoria y, por ejemplo, el tercer marcador de selección puede ser idéntico al primer marcador, ya que en el momento de insertar el tercer fragmento de vector ya se han eliminado el primer fragmento de vector y el primer marcador.
- En un aspecto, hay que confirmar que la inserción es correcta antes de proseguir a la siguiente etapa de todo proceso de clonación por etapas, por ejemplo, mediante la confirmación de la estructura del BAC con matrices genómicas de alta densidad para escrutar las células ES para identificar las que tienen inserciones de BAC intactos, secuenciación y verificación por PCR.
- En un aspecto, el procedimiento utiliza la recombinación específica de sitio para la inserción de uno o varios vectores en el genoma de una célula, tal como una célula ES. Los sistemas de recombinasa específica de sitio se conocen bien en la técnica y pueden incluir Cre-lox, y FLP/FRT o combinaciones de los mismos, en los cuales la recombinación se produce entre 2 sitios que tienen homología de secuencia.
- Los BAC adecuados se pueden adquirir al Centro Sanger, véase «A genome-wide, end-sequenced 129Sv BAC library resource for targeting vector construction». Adams D. J., Quail M. A., Cox T., van der Weyden L., Gorick B. D., Su Q., Chan W. I., Davies R., Bonfield J. K., Law F., Humphray S., Plumb B., Liu P., Rogers J., Bradley A. *Genomics*. Dic 2005, 86 (6): 753-8. Epub 27 de octubre de 2005. The Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridgeshire CB10 1SA, Reino Unido. Los BAC que contienen ADN de humano también se pueden comprar a, por ejemplo, Invitrogen. En Osoegawa K et al., *Genome Research*, 2001, 11: 483-496 se describe una genoteca adecuada.
- En un aspecto un procedimiento de la invención comprende específicamente:
- (1) inserción de un primer fragmento de ADN en una célula ES no humana, en donde el fragmento contiene una primera porción del ADN de la región VDJ o VJ de humano y una primera porción de vector que contiene un primer marcador de selección;
 - (2) opcionalmente, delección de una parte de la primera porción de vector,
 - (3) inserción de un segundo fragmento de ADN en una célula ES no humana que contiene el primer fragmento de ADN, en donde la inserción se produce dentro de la primera porción de vector, en donde el segundo fragmento de ADN contiene una segunda porción de la región VDJ o VJ de humano y una segunda porción de vector que contiene un segundo marcador de selección,
 - (4) delección del primer marcador de selección y de la primera porción de vector, preferiblemente mediante la acción de una enzima recombinasa;
 - (5) inserción de un tercer fragmento de ADN en una célula ES no humana que contiene el segundo fragmento de ADN, en donde la inserción se produce dentro de la segunda porción de vector, en donde el tercer fragmento de ADN contiene una tercera porción de la región VDJ o VJ de humano y una tercera porción de vector que contiene un tercer marcador de selección,
 - (6) delección del segundo marcador de selección y una segunda porción de vector; y
 - (7) repetición de las etapas de inserción y delección, cuando sea necesario, para el cuarto y posteriores fragmentos de las regiones VDJ o VJ de humano, cuando sea necesario, para producir una célula ES con una parte o toda la región VDJ o VJ de humano insertada tal y como se describe en la presente memoria y, convenientemente, retirar todas las porciones de vector dentro del genoma de la célula ES.
- En otro aspecto la invención comprende:
- 1 Inserción de ADN que forma un casete de iniciación en el genoma de una célula;

- 2 Inserción de un primer fragmento de ADN en el casete de iniciación, en donde el primer fragmento de ADN comprende una primera porción de un ADN de humano y una primera porción de vector que contiene un primer marcador de selección o que genera un marcador de selección tras la inserción;
 - 3 Opcionalmente, retirada de parte del ADN del vector;
 - 5 4 Inserción de un segundo fragmento de ADN dentro de la porción del vector del primer fragmento de ADN, en donde el segundo fragmento de ADN contiene una segunda porción del ADN de humano y una segunda porción de vector, en donde la segunda porción de vector contiene un segundo marcador de selección, o genera un segundo marcador de selección tras la inserción;
 - 5 5 Opcionalmente, retirada de todo ADN de vector para permitir que el primer y el segundo fragmento de ADN humano formen una secuencia contigua; y
 - 10 6 Repetición de las etapas de inserción del ADN de VDJ de humano y retirada del ADN de vector, cuando sea necesario, para producir una célula con toda o parte de la región VDJ o VJ de humano suficiente para ser capaz de generar, junto a una región constante del hospedador, un anticuerpo quimérico,
- en donde la inserción de uno, o más, o todos los fragmentos de ADN utiliza la recombinación específica de sitio.
- 15 En un aspecto, el mamífero no humano es capaz de generar una diversidad de al menos 1×10^6 combinaciones diferentes de secuencias de inmunoglobulinas quiméricas funcionales.
- En un aspecto, la integración se realiza en las células ES procedentes de la cepa de ratón 129S5 o 129Sv, C57BL/6N, C57BL/6J.
- 20 En un aspecto los animales no humanos, tales como ratones se generan en un fondo genético carente de RAG-1, u otro fondo genético adecuado que impide la formación de linfocitos T y B maduros en el hospedador.
- El mamífero no humano reivindicado en esta memoria es un roedor, convenientemente un ratón, y las células de la invención son células de roedor o células ES, convenientemente células ES de ratón.
- 25 Las células ES de la presente invención pueden utilizarse para generar animales mediante la tecnología bien conocida en la técnica, que comprende la inyección de la célula ES en un blastocisto seguido de la implantación de los blastocistos quiméricos en las hembras para producir una camada que se pueda criar y se pueda seleccionar de ellos los recombinantes homocigotos que tienen la inserción requerida. En un aspecto, la invención se refiere a un animal quimérico que comprende un tejido procedente de las células ES y un tejido procedente del embrión hospedador. En un aspecto la invención se refiere a animales generados después de la alteración genética, que incluye animales que tienen recombinantes homocigotos para las regiones VDJ y/o VJ.
- 30 En un aspecto adicional la invención se refiere a un procedimiento para producir un anticuerpo específico contra un antígeno deseado, en donde el procedimiento comprende la inmunización de un mamífero no humano transgénico como anteriormente con el antígeno deseado y recuperar el anticuerpo (véase, p. ej., Harlow, E. y Lane, D., 1998, 5.ª edición, *Antibodies: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY; y Pasqualini y Arap, *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2004) 101: 257-259). Convenientemente, se introduce una
 - 35 cantidad inmunógena del antígeno. La invención también se refiere a un procedimiento para detectar un antígeno deseado que comprende la detección de un anticuerpo producido como más arriba con un agente de detección secundario que reconoce una porción de dicho anticuerpo.
- 40 En un aspecto adicional la invención se refiere a un procedimiento para producir un anticuerpo completamente humanizado que comprende la inmunización de un mamífero no humano transgénico como más arriba con el antígeno deseado, la recuperación del anticuerpo o de las células que expresan el anticuerpo y, luego, reemplazar la región constante del mamífero no humano con una región constante de humano. Esto puede realizarse mediante técnicas de clonación estándar a nivel del ADN para reemplazar la región constante del mamífero no humano con una secuencia de ADN de la región constante de humano adecuada, véase, p. ej., Sambrook, J. y Russell, D. (2001, 3.ª edición) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY).
- 45 En un aspecto adicional la invención se refiere a anticuerpos y cadenas de anticuerpo humanizados producidos de acuerdo con la presente invención, tanto en forma quimérica como en forma completamente humanizada, y el uso de dichos anticuerpos en la medicina. La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende tales anticuerpos y un vehículo u otro excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 50 Las cadenas de anticuerpo que contienen secuencias humanas, tales como las cadenas de anticuerpo quimérico humano-no humano se consideran humanizadas en la presente memoria en virtud de la presencia de la región de las regiones que codifican la proteína humana. Se pueden producir anticuerpos completamente humanizados partiendo del ADN que codifica una cadena de anticuerpo quimérica descrita en la presente memoria por medio de

técnicas estándares.

Los procedimientos para generar anticuerpos monoclonales y policlonales se conocen bien en la técnica y la presente invención se refiere tanto a anticuerpos monoclonales como a policlonales de anticuerpos quiméricos o completamente humanizados que se sintetizan en respuesta a una prueba de provocación al antígeno en mamíferos no humanos de la presente invención.

Aún en otro aspecto, los anticuerpos o cadenas de anticuerpo quiméricos generados en la presente invención pueden manipularse, convenientemente a nivel de ADN, para generar moléculas con propiedades o estructura similares a las de los anticuerpos, tal como una región variable de humano de una cadena ligera o pesada que carece de una región constante, por ejemplo, un dominio de anticuerpo; o una región variable de humano con alguna región constante de cadena ligera o pesada de la misma especie o de diferente especie; o una región variable de humano con una región constante que no se produce en la naturaleza; o una región variable de humano junto con cualquier otra proteína acompañante para fusión. La invención se refiere a tales derivados de anticuerpos quiméricos procedentes de anticuerpos quiméricos identificados de acuerdo con la presente invención.

En esta memoria se describe el uso de animales de la presente invención en el análisis de los probables efectos de los fármacos y vacunas en el contexto de un repertorio de anticuerpos casi humanos.

En la presente memoria se describe un procedimiento para identificar o validar un fármaco o vacuna, en donde el procedimiento comprende la administración de la vacuna o el fármaco a un mamífero de la presente invención y monitorizar uno o varios de: la respuesta inmunitaria, el perfil de seguridad, el efecto sobre la enfermedad.

En la presente memoria se describe un kit que comprende un anticuerpo o derivado de anticuerpo como el descrito en la presente memoria y o bien instrucciones para el uso de tal anticuerpo, o bien un reactivo de laboratorio adecuado, tal como un tampón, reactivo de detección de anticuerpo.

En la presente memoria se describen:

Un mamífero no humano cuyo genoma comprende:

(a) la región VDJ de IgH de humano por delante de la región constante del mamífero no humano hospedador; y

(b) las regiones V y J de la cadena ligera κ de Ig de humano por delante de la región constante de la κ del mamífero no humano hospedador y/o las regiones V y J de la cadena ligera λ de Ig de humano por delante de la región constante de la λ del mamífero no humano hospedador;

en donde el mamífero no humano es capaz de producir un repertorio de anticuerpos quiméricos que tienen una región constante del mamífero no humano y una región variable de humano,

y opcionalmente en donde el genoma del mamífero no humano está modificado para impedir la expresión de anticuerpos completamente específicos de la especie hospedadora.

Una célula ES de mamífero no humano cuyo genoma comprende:

(a) la región V, D y J de IgH de humano por delante de una región constante del mamífero no humano; y

(b) las regiones V y J de la cadena ligera κ del locus de Ig de humano por delante de la región constante de la κ del mamífero no humano hospedador, y/o las regiones V y J de la cadena ligera λ del locus de Ig de humano por delante de la región constante de la λ del mamífero no humano hospedador

en donde la célula ES es capaz de desarrollarse en un mamífero no humano, y que es capaz de producir un repertorio de anticuerpos que son quiméricos, que tienen una región constante de mamífero no humano y una región variable de humano.

Un procedimiento para producir un mamífero no humano transgénico capaz de producir un repertorio de anticuerpos quiméricos, en donde los anticuerpos tienen una región constante del mamífero no humano y una región variable de humano, en donde el procedimiento comprende insertar en un genoma de célula ES de mamífero no humano, mediante recombinación homóloga,

(a) la región VDJ de IgH de humano por delante de la región constante de la cadena pesada del mamífero no humano hospedador, y

(b) la región VJ de la cadena λ y κ de IgL de humano por delante de la región constante de la cadena λ o κ del mamífero no humano hospedador, respectivamente

de tal forma que el mamífero no humano es capaz de producir un repertorio de anticuerpos quiméricos que tienen

una región constante de mamífero no humano y una región variable de humano, en donde las etapas (a) y (b) se pueden llevar a cabo en cualquier orden y cada una de las etapas (a) y (b) se puede llevar a cabo por etapas o en una única etapa.

- 5 En un aspecto, la inserción de las regiones VDJ o VJ de humano por delante de la región constante del mamífero no humano hospedador está acompañada de la inserción por etapas de varios fragmentos mediante recombinación homóloga.

En un aspecto, las inserciones por etapas comienzan en un sitio donde está insertado un casete de iniciación en el genoma de una célula ES, lo que proporciona una única región de integración que consiste en una secuencia de esqueleto de BAC y un marcador de selección negativo.

- 10 En un aspecto, el primer fragmento de la región variable de humano se inserta por recombinación homóloga en la secuencia de esqueleto de BAC del casete de iniciación, y dicho marcador de selección negativa y casete de iniciación se retiran posteriormente mediante recombinación entre las secuencias diana de la recombinasa.

- 15 En un aspecto, la repetición de las inserciones en el punto de integración de la secuencia de iniciación del esqueleto de BAC y la posterior retirada del esqueleto mediante la reorganización entre las secuencias diana de la recombinasa se repite para construir toda la región VDJ de humano por delante de la región constante del no mamífero hospedador.

Otros aspectos incluyen:

- 20 Un procedimiento para producir un anticuerpo específico contra un antígeno deseado, en donde el procedimiento comprende inmunizar a un mamífero no humano como el descrito en la presente memoria con el antígeno deseado y recuperar el anticuerpo o una célula que produce el anticuerpo.

Un procedimiento para producir un anticuerpo completamente humanizado que comprende inmunizar a un mamífero no humano como el descrito en la presente memoria y luego reemplazar la región constante de mamífero no humano de un anticuerpo que reacciona específicamente contra el antígeno con una región constante de humano, convenientemente mediante ingeniería genética del ácido nucleico que codifica el anticuerpo.

- 25 Un procedimiento, célula o mamífero como los descritos en la presente memoria, en donde una secuencia de ADN de la región codificante de humano se encuentra en una disposición funcional con una secuencia de control de mamífero no humano, de tal forma que la transcripción del ADN está controlada por la secuencia de control de mamífero no humano. En un aspecto, la región V, D o J de la región codificante de humano se encuentra en una disposición funcional con una secuencia promotora de ratón.

- 30 En la presente memoria se describe un anticuerpo humanizado producido de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria y el uso de un anticuerpo humanizado así producido en la medicina.

- 35 Se comprenderá que determinadas realizaciones descritas en la presente memoria se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención. Las principales características de esta invención pueden emplearse en diferentes realizaciones sin alejarse del alcance de la invención. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de adivinar a través de tan solo el estudio habitual, numerosos equivalentes a los procedimientos específicos descritos en la presente memoria. Tales equivalentes se considera que están dentro del alcance de esta invención y que están cubiertos por las reivindicaciones. Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la especificación son indicativas del nivel de pericia de los expertos en la técnica a la cual pertenece la invención. Todas las publicaciones y solicitudes de patente se incorporan en esta memoria por referencia en la misma medida que si se indicara específicamente e individualmente para cada publicación o solicitud de patente que se incorpora por referencia. El uso de la palabra «un» o «una», cuando se utiliza con el término «comprende» en las reivindicaciones y/o en la especificación, puede significar «uno (1)» pero también es coherente con el significado de «uno o varios», «al menos uno» y «uno o más de uno». El uso de la terminología «o» en las reivindicaciones se utiliza con el significado «y/o» a menos que se indique explícitamente que se refiere sólo a alternativas o que las alternativas se excluyen mutuamente, aunque la descripción apoya una definición que se refiere a sólo alternativas y «y/o». A lo largo de esta solicitud, la terminología «aproximadamente» se utiliza para indicar que un valor incluye la variación inherente de error del dispositivo, el procedimiento que se emplea para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos de estudio.

- 50 Tal y como se utiliza en esta especificación y en las reivindicaciones, las palabras «que comprende» (y cualquier forma de comprender, tal como «comprenden» y «comprende»), «que tiene» (y cualquier forma de tener, tal como «tienen» y «tiene»), «que incluye» (y cualquier forma de incluir, tal como «incluye» e «incluyen») o «que contiene» (y cualquier forma de contener, tal como «contiene» y «contienen») son inclusivas o abiertas y no descartan otros elementos o etapas de procedimiento que no se han citado.

La terminología «o combinaciones de los mismos» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos enumerados que preceden al término. Por ejemplo, «A, B, C o combinaciones de las mismas» pretende incluir al menos una de: A, B, C, AB, AC, BC, o ABC y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Continuando con este ejemplo, se incluyen expresamente combinaciones que contienen repeticiones de uno o varios elementos o términos, tal como BB, AAA, MB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB y etcétera. El experto en la técnica comprenderá que típicamente no hay límite al número de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que resulte evidente a partir del contexto.

Cualquier parte de esta descripción puede ser leída en combinación con cualquier otra parte de la descripción, a menos que resulte evidente a partir del contexto.

Todas las composiciones y/o procedimientos descritos y reivindicados en la presente memoria pueden realizarse y ejecutarse sin demasiada experimentación a la luz de la presente descripción. Aunque las composiciones y procedimientos de esta invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones a las composiciones y/o procedimientos y en las etapas o en la secuencia de etapas del procedimiento descrito en la presente memoria sin alejarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Todos estos sustitutos y modificaciones similares que resultan evidentes para los expertos en la técnica se considera que están dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención tal y como está definido en las reivindicaciones anexas.

La presente invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes. El ejemplo 3 describe datos experimentales que se han obtenido y que apoyan la demostración preliminar de algunos aspectos de la invención, mientras que los ejemplos 1 y 2 proporcionan una guía detallada para la persona experta en la técnica a la hora de llevar a cabo la invención reivindicada.

Ejemplo 1

Estrategia global.

Se puede conseguir un modelo de ratón de la invención mediante la inserción de aproximadamente 960 kb del locus de la cadena pesada de humano que contiene todas las regiones V, D y J por delante de la región constante de ratón y 473 kb de la región de la cadena κ de humano por delante de la región constante de ratón. Alternativamente, o en tándem, la región de la cadena λ de humano se inserta por delante de la región constante de ratón. Esta inserción se consigue mediante integración génica en las células ES gracias a la tecnología bien conocida en la técnica.

La inserción con gran fidelidad de las regiones V-D-J intactas en cada locus en su configuración nativa (tipo silvestre) se consigue convenientemente mediante la inserción de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) de humano en el locus. Convenientemente, los BAC están recortados de tal forma que en el locus final no se duplica ni se pierde ninguna secuencia en comparación con el original. Tal recorte se puede llevar a cabo mediante ingeniería por recombinación.

Los BAC de humano relevantes y convenientemente recortados que cubren estos locus tienen un tamaño medio de 90 kb.

En una estrategia, todo el complemento de los elementos D y J humanos así como siete u ocho regiones V de humano están cubiertos por el primer BAC a insertar en el esquema de inserción experimental descrito más adelante. Los primeros BAC que se insertarán en los locus de IgH e IgK pueden contener las siguientes regiones V: IgH: V6-1, VII-1-1, V1-2, VIII-2-1, V1-3, V4-4, V2-5 e IgK: V4-1, V5-2, V7-3, V2-4, V1-5, V1-6, V3-7, V1-8.

Convenientemente la funcionalidad de cada locus se evalúa tras la inserción del primer BAC mediante ratones quiméricos y también tras cada adición posterior de BAC. Véase más adelante una descripción detallada de esta prueba de funcionalidad.

Se requerirán nueve inserciones adicionales de BAC en el locus *IgH* y cinco en el *IgK* para proporcionar todo el complemento de las regiones V de humano que cubren las 0,96 Mb y 0,473 Mb de los locus *IgH* e *IgK*, respectivamente.

No todos los BAC conservan su configuración de tipo silvestre cuando están insertados en el genoma de las células ES. Así pues, hemos desplegado matrices genómicas de alta densidad para escrutar las células ES e identificar las que presentan inserciones intactas de BAC (Barrett, M. T., Scheffer, A., Ben-Dor, A., Sampas, N., Lipson, D., Kincaid, R., Tsang, P., Curry, B., Baird, K., Meltzer, P. S., et al. (2004). «Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 17765-17770). Este escrutinio también permite que se puedan identificar y seleccionar clones de ES en los que el genoma de la célula ES está comprometido y, por consiguiente, que no serían capaces

de poblar la línea de células reproductoras de los animales quiméricos. Otras herramientas genómicas adecuadas para facilitar esta valoración incluyen la secuenciación y verificación por PCR.

Así pues, en un aspecto, la estructura correcta del BAC se confirma antes de proseguir con la siguiente etapa.

Está implícito a partir de la descripción anterior que para reconstruir completamente los locus con los BAC de 90 kb es necesario realizar un mínimo de 10 etapas de inserción para *IgH* y 5 etapas para *IgK*. Los ratones con un locus *IgL* se pueden generar de una manera similar al locus *IgK*. Se requieren etapas adicionales para retirar los marcadores de selección necesarios para apoyar la integración génica. Ya que estas manipulaciones se realizan por etapas en las células ES, en un aspecto se conserva la capacidad de transmisión de las células reproductoras a lo largo de este proceso.

Mantener la funcionalidad de los clones de células ES a lo largo de varias rondas de manipulación sin necesidad de comprobar la potencialidad de las células reproductoras de la línea de células ES en cada etapa puede ser importante en la presente invención. Las líneas celulares actualmente en uso para los proyectos de genosupresión globales KOMP y EUCOMM se han modificado dos veces antes de su uso para este proyecto y la velocidad de transmisión de sus células reproductoras sigue siendo la misma que la de las células parentales (dichas líneas están disponibles al público, véase www.komp.org y www.eucomm.org). Esta línea celular, denominada JM8, puede generar ratones que proceden al 100% de las células ES en las condiciones de cultivo publicadas (Pettitt, S. J., Liang, Q., Raidan, X. Y., Moran, J. J., Prosser, H. M., Beier, D. R., Lloyd, K. C., Bradley, A. y Skarnes, W. C. (2009). «Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources». *Nature Methods*). Se ha demostrado que estas células son capaces de contribuir reproduciblemente a formar el tejido somático y germinal de los animales quiméricos utilizando las condiciones de cultivo estándares para las células ES de ratón. Esta capacidad se puede encontrar en las células cultivadas con una línea de células alimentadoras estándares (SNL, por su nombre en inglés) e incluso libres de alimentadoras, crecidas sólo en placas de cultivo de tejidos recubiertas con gelatina. Una sublínea particular, JM8A3, mantuvo la capacidad de poblar las células reproductoras de quimeras tras varias rondas en serie de subclonación. La manipulación genética extensa vía, por ejemplo, la recombinación homóloga — como sería el caso en la presente invención — no puede comprometer la pluripotencia de las células. La capacidad para generar quimeras con tan alto porcentaje de tejido procedente de células ES tiene otras ventajas. Primero, unos niveles altos de quimerismo se correlacionan con el potencial de transmisión de las células reproductoras y proporciona un ensayo sustitutivo para la transmisión de las células reproductoras, que sólo necesita 5 a 6 semanas. Segundo, ya que estos ratones proceden de las células ES al 100%, se puede analizar directamente el locus manipulado genéticamente, con lo que se quita el retraso ocasionado por la crianza. El análisis de la integridad de los nuevos locus de *Ig* se puede hacer en la quimera, ya que el embrión hospedador procederá de animales que son mutantes para el gen de RAG-1 tal y como se describe en el apartado siguiente.

Otra línea celular que puede utilizarse es una línea celular HPRT-ve, tal como AB2.1, tal y como se describe en «Chromosome engineering in mice», Ramírez-Solis R, Liu P y Bradley A, *Nature* 1995; 378; 6558; 720-4.

Complementación de RAG-1.

Mientras que muchos clones generarán ratones procedentes de ES al 100%, algunos no lo harán. Así pues, en cada etapa, los ratones se generan en un fondo genético que carece de RAG-1. Esto proporciona ratones con linfocitos B y T que proceden de ES al 100% y que pueden utilizarse directamente para la inmunización y la producción de anticuerpos. Se pueden utilizar las células que tienen un fondo genético que carece de RAG-2, o un fondo genético combinado que carece de RAG-1/RAG-2, o mutaciones equivalentes en las cuales los ratones producen sólo linfocitos B y/o linfocitos T procedentes de las células ES.

Para que sólo estén activos los locus *IgH* o *IgK* de ratón-humano en estos ratones, los locus *IgH* e *IgK* de ratón-humano pueden modificarse genéticamente en una línea celular en la cual un alelo del locus de *IgH* o de *IgK* ya está inactivado. Alternativamente, tras la inserción se puede llevar a cabo la inactivación de locus de la *Ig* del hospedador, tal como los locus *IgH* o *IgK*.

Las cepas de ratón que tienen el gen de RAG-1 mutado son inmunodeficientes porque no tienen linfocitos B o T maduros (patente de los EE.UU. US 5.859.307). Los linfocitos T y B sólo se diferencian si se produce una recombinación de V(D)J correcta. Dado que RAG-1 es una enzima crucial para esta recombinación, los ratones que carecen de RAG-1 son inmunodeficientes. Si los embriones hospedadores son mutantes genéticamente homocigotos de RAG-1, una quimera producida por la inyección de tal embrión no podrá producir anticuerpos si los tejidos linfáticos del animal proceden del embrión hospedador. Sin embargo, las células JM8 y AB2.1, por ejemplo, contribuyen por lo general en exceso al 80% de los tejidos somáticos del animal quimérico y, por consiguiente, suelen poblar el tejido linfático. Las células JM8 tienen actividad RAG-1 de tipo silvestre y, por lo tanto, los anticuerpos producidos en el animal quimérico estarían codificados sólo por el genoma de las células ES JM8. Por lo tanto, el animal quimérico puede exponerse a un antígeno mediante inmunización y, posteriormente, producir anticuerpos contra ese antígeno. Esto permite que el experto en la técnica compruebe la funcionalidad de los locus de *IgH* e *IgK* de humano/ratón modificados genéticamente como se describe en la presente memoria. Véanse las

figuras 19 y 20.

El experto en la técnica utilizaría el animal quimérico como está descrito para determinar el grado de diversidad de anticuerpos (véase, p. ej., Harlow, E. y Lane, D. 1998, 5.^a edición. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY). Por ejemplo, en el suero del animal quimérico podría comprobarse la existencia de algunos epítopos de anticuerpo mediante la fijación a antisuero antiidiotipo específico, por ejemplo, en un ensayo ELISA. El experto en la técnica podría también secuenciar los genomas de clones de linfocitos B procedentes del animal quimérico y comparar dicha secuencia con la secuencia de tipo silvestre para averiguar el nivel de hipermutación, en donde tal hipermutación es indicativa de la maduración normal de los anticuerpos.

El experto en la técnica también utilizaría dicho animal quimérico para examinar el funcionamiento del anticuerpo, en donde dichos anticuerpos están codificados por los locus de Ig modificados genéticamente (véase., p. ej., Harlow, E. y Lane, D. 1988, 5.^a edición, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY). Por ejemplo, se podrían analizar los antisueros mediante la fijación a un antígeno, en donde dicho antígeno se utilizó para inmunizar el animal quimérico. Tal medición podría realizarse mediante un ensayo ELISA. Alternativamente, el experto en la técnica podría comprobar la neutralización del antígeno por la adición de antisueros recogidos del animal quimérico inmunizado adecuadamente.

Los expertos en la técnica saben bien que los resultados positivos para cualquiera de estos ensayos demuestran que los locus de Ig modificados genéticamente, el objetivo de la presente invención, son capaces de codificar anticuerpos con regiones variables de humanos y regiones constantes de ratón, siendo dichos anticuerpos capaces de funcionar de la misma manera que los anticuerpos de tipo silvestre.

Técnicas experimentales.

La ingeniería de recombinación para producir vectores para usarlos en la recombinación homóloga en las células ES se describe en, por ejemplo, las patentes internacionales WO9929837 y WO0104288, y la tecnología se conoce bien en la técnica. En un aspecto, la ingeniería de recombinación del ADN de humano se realiza con los BAC como fuente de dicho ADN humano. El ADN de BAC de humano se aislará con el kit de purificación de BAC de Qiagen. El esqueleto de cada BAC de humano se modificará mediante ingeniería de recombinación para obtener exactamente la misma configuración o una similar a la del BAC ya insertado en la región de IgH de ratón. El inserto genómico de cada BAC de humano se recortará mediante ingeniería de recombinación de tal forma que una vez que los BAC están insertados, se formará una parte contigua ininterrumpida de la región genómica V(D)J de humano en el locus de IgH o IgK de ratón. La transfección del ADN de BAC mediante electroporación y el genotipado se realizarán según los protocolos estándares (Prosser, H. M., Rzdzińska, A. K., Steel, K. P., y Bradley, A. (2008). «Mosaic complementation demonstrates a regulatory role for myosin VIIa in actin dynamics of stereocilia», *Molecular and Cellular Biology*, 28, 1702-1712; Ramírez-Solis, R., Davis, A. C., y Bradley, A. (1993). «Gene targeting in embryonic stem cells». *Methods in Enzymology* 225, 855-878). La ingeniería de recombinación se realizará mediante los procedimientos y reactivos desarrollados por los laboratorios de Pentao Liu y Don Court (Chan, W., Costantino, N., Li, R., Lee, S. C., Su, Q., Melvin, D., Court, D. L y Liu, P. (2007). «A recombineering based approach for high-throughput conditional knockout targeting vector construction». *Nucleic Acids Research* 35, e64).

Éstas y otras técnicas para la inserción génica y la recombinación de fragmentos cromosómicos procedentes de BAC en un genoma de mamífero no humano, tal como un ratón, se describen en, por ejemplo, <http://www.eucomm.org/information/targeting> y <http://www.eucomm.org/information/publications>.

El cultivo celular de las líneas celulares procedentes de C57BL/6N, tal como las células ES de macho JM8, seguirán las técnicas estándares. Las células ES JM8 han demostrado ser competentes a la hora de contribuir extensivamente a tejidos somáticos y a los tejidos reproductores, y se utilizan para grandes programas de mutagénesis de ratones en el Instituto Sanger tal como EUCOMM y KOMP (Pettitt, S. J., Liang, Q., Rairdan, X. Y., Moran, J. L., Prosser, H. M., Beier, D. R., Lloyd, K. C., Bradley, A., y Skarnes, W. C. (2009) «Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources». *Nature Methods*). Las células ES JM8 ($1,0 \times 10^7$) se electroporarán (500 μ F, 230 V; BioRad) con 10 μ g de ADN de BAC de humano linealizado con I-SceI. Los transfectantes se seleccionarán con puromicina (3 μ g/ml) o G418 (150 μ g/ml). La selección comenzará a las 24 horas (con G418) o 48 horas (con puromicina) de la electroporación y tendrá lugar durante 5 días. Los 10 μ g de ADN de BAC de humano linealizado pueden producir hasta 500 colonias de células ES resistentes a la puromicina o al G418. Las colonias de células ES resistentes a antibióticos se recogerán en placas de cultivo de células de 96 pocillos para genotiparlas y así identificar los clones con integración.

Una vez que se han identificado los clones de células ES de ratón con una integración, se analizarán mediante hibridación genómica comparativa con matrices (CGH, por su nombre en inglés) para determinar la integridad total del genoma (Chung, Y. J., Jonkers, J., Kitson, H., Fiegler, H., Humphray, S., Scott, C., Hunt, S., Yu, Y., Nishijima, I., Velds, A., et al. (2004). «A whole-genome mouse BAC microarray with 1-Mb resolution for analysis of DNA copy number changes by array comparative genomic hybridization» *Genome Research* 14, 188-196; y Liang, Q., Conte, N., Sharknes, W. C., y Bradley, A. (2008). «Extensive genomic copy number variation in embryonic stem cells».

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 17453-17456). Las células ES que tienen genomas anómalos no contribuyen de manera eficaz a los tejidos reproductores de los ratones quiméricos. Se examinará la integridad del BAC mediante amplificación por PCR de cada gen V funcional conocido en el BAC. Por ejemplo, en una estrategia, el primer BAC de humano elegido para el locus IgH tiene 6 genes V funcionales. Para confirmar la integridad de este BAC por la presencia de estos 6 genes V de IgH, se diseñarán al menos 14 pares de cebadores para PCR y se utilizarán para amplificar por PCR el ADN genómico de las células ES que llevan la integración. Se considera que el BAC insertado no se ha reorganizado cuando el tamaño y la secuencia de estos fragmentos son como los del tipo silvestre humano.

Una CGH más detallada también confirmará la integridad de los BAC insertados. Por ejemplo, el experto en la técnica podría utilizar una plataforma de aCGH de oligonucleótidos, que está desarrollada por Agilent Technologies, Inc. Esta plataforma no sólo permite estudiar la variación del número de copias del ADN por todo el genoma a gran resolución (Barrett, M. T., Scheffer, A., Ben-Dor, A., Sampas, N., Lipson, D., Kincaid, R., Tsang, P., Curry, B., Baird, K., Meltzer, P. S., et al. (2004). «Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 17765-17770), sino que permite examinar una región concreta del genoma mediante matrices diseñadas a medida. Al comparar las técnicas de aCGH tradicionales que se basan en sondas de ADNc o sondas de todo el BAC, las sondas oligonucleotídicas de 60 nucleótidos pueden asegurar la hibridación específica y la alta sensibilidad y precisión que se necesitan para detectar las alteraciones cromosómicas por modificación genética que se han realizado. Por ejemplo, los oligonucleótidos diseñados para que se hibriden a intervalos regulares a lo largo de toda la longitud del BAC insertado detectarían incluso deleciones, inserciones u otras reorganizaciones muy cortas. Asimismo, esta plataforma proporciona la mayor flexibilidad para los diseños de micromatrices a medida. El ADN genómico de las células ES con integración y el ADN genómico individual humano normal se marcarán por separado con fluoróforos y se hibridarán a la matriz. Los soportes de las matrices se escanearán con un escáner de micromatrices de ADN de Agilent Technologies. La intensidad de fluorescencia recíproca de los fluoróforos Cy5 y Cy3 en cada imagen de la matriz y el logaritmo en base 2 de los valores de la proporción se extraerán con el programa informático Bluefuse (Bluegenome). Los puntos con patrones de fluorescencia incoherentes («confianza» < 0,29 o «calidad» = 0) se descartarán antes de normalizar todos los valores de los log2 de las proporciones. Dentro de un experimento, el log2 de la proporción entre -0,29 y +0,29 para la señal de cualquier sonda de oligonucleótidos se considera que no implica ningún cambio en el número de copias. El umbral del log2 de la proporción para la «duplicación» es normalmente > 0,29999, y para la deleción es < 0,29999.

Una vez que el primer BAC humano está insertado en el locus IgH de ratón y se confirma que está en su configuración nativa intacta, el esqueleto de BAC flanqueado por FRT se escindiría mediante la recombinasa Fip específica de sitio. Si la recombinación normal de FRT catalizada por Fip no es suficientemente alta, se puede utilizar Flo, una versión mejorada de la recombinasa Fip que en algunos análisis es de 3 a 4 veces más eficaz en las células ES que la Fip original. Después de haber escindido el esqueleto del BAC, las células ES se harán sensibles a la puomicina (o al G418) y resistentes a FIAU (por la pérdida del casete TK). Cada escisión se caracterizará adicionalmente mediante amplificación por PCR del fragmento de unión con el uso de cebadores del ADN genómico humano. Estas células ES sin el esqueleto del BAC flanqueado por FRT se utilizarán en la siguiente ronda de inserción de BAC de humano y para la inyección de blastocistos.

La integración en el genoma de una célula ES para producir un ratón transgénico puede llevarse a cabo con un protocolo como el explicado con referencia a las figuras 1 a 18 adjuntas.

La figura 1 ilustra el esqueleto básico de tres vectores; un casete de iniciación y 2 vectores con insertos grandes, 1 y 2, respectivamente. El casete de iniciación comprende secuencias homólogas al sitio de inserción deseado en el genoma de ratón, esos sitios que flanquean un marcador de selección y secuencia de relleno con el cebador para el genotipado por PCR para confirmar que inserción de los BAC ha sido correcta. La secuencia del cebador en el relleno proporciona la base para el genotipado de cada etapa de adición de BAC. Se considera que esta secuencia proporciona una plantilla de secuencia bien validada y robusta para el cebador de la PCR y puede localizarse en el sitio de I-SceI, idealmente a aproximadamente 1 kb del inserto del BAC.

Los vectores con insertos grandes comprenden ADN de humano en plásmidos con marcadores de selección y un único sitio de restricción para la linealización del plásmido para ayudar en la recombinación homóloga en el genoma de la célula ES.

La figura 2 ilustra la inserción de un casete de iniciación en el genoma de ratón mediante recombinación homóloga entre los exones J4 y C α de ratón. La selección con puomicina permite identificar las células ES con la inserción del casete. Pu(Δ)tk es una proteína de fusión bifuncional entre la puomicina N-acetiltransferasa (Puro) y una versión troncada de la timidina cinasa de tipo 1 del virus del herpes simple (Δ Tk). Las células ES (troncales embrionarias) murinas que están transfectadas con pu(Δ)tk se vuelven resistentes a la puomicina y sensibles al 1-(2-desoxi-2-fluoro-1- β -D-arabino-furanosil)-5-yodouracilo (FIAU). A diferencia de otros transgenes de la tk del HSV1, pu(Δ)tk se transmite con facilidad a través de las células reproductoras macho. Esta pu(Δ)tk es un marcador de selección

positivo/negativo cómodo que se puede utilizar ampliamente en muchas aplicaciones de las células ES.

La figura 3 ilustra a integración del inserto grande del vector 1 en el genoma de las células ES de ratón. La linealización del vector se realiza en la misma posición que la secuencia sel cebador en el relleno, lo que asegura una estrategia de genotipado por reparación de huecos, bien conocida en la técnica (véase Zheng et al. *NAR* 1999, vol 27, 11, 2354-2360). En esencia, la inserción aleatoria del vector de integración en el genoma no «reparará» el hueco mientras que un acontecimiento de recombinación homóloga sí reparará el hueco. La yuxtaposición de las secuencias de los cebadores de PCR adecuados permite escrutar las colonias de forma individual en busca de un fragmento de PCR positivo que indique que la inserción fue correcta. La selección positiva con G418 permite identificar las células ES de ratón que contienen el marcador de selección *neo*. Puede realizarse la verificación por PCR de todas las regiones V, D y J críticas. La hibridación genómica comparativa de matrices puede utilizarse para validar la estructura del BAC.

La figura 4 ilustra el casete *puro-Δ-tk* y el esqueleto plasmídico del BAC se elimina utilizando Flpe y selección con FIAU. Ya que la Flpe trabaja con poca eficacia en las células ES de ratón (delección del 5% con la expresión transitoria de Flpe), se espera que en a mayoría de los casos, la recombinación se produzca entre los dos sitios FRT que flanquean el esqueleto del BAC. También puede analizarse con la Flpo para descubrir la eficacia de la recombinación entre dos sitios de FRT que están a 10 kb.

Dado que se puede seleccionar la etapa de delección de FRT, es posible agrupar los clones resistentes a FIAU y proseguir inmediatamente a la siguiente etapa en paralelo con el análisis clonal. Alternativamente, puede ser deseable mostrar mediante PCR de poco alcance que las secuencias humanas ahora están adyacentes a las del ratón, tal y como está ilustrado (cebador Hu1 y cebador Mo).

En esta etapa se habrá insertado un locus humano de 200 kb.

La figura 5 ilustra un segundo vector con inserto grande que se integra en el cromosoma de las células ES. El BAC de humano se integra en el locus IgH de ratón usando la misma inserción del casete de iniciación y luego la linealización del BAC con *I-SceI*, integración del BAC en el casete de iniciación y estrategia de genotipado por reparación de huecos. La verificación de la inserción del BAC se lleva a cabo igual que antes.

La figura 6 ilustra que el esqueleto del BAC flanqueado por FRTY del vector 2 con el inserto grande y el marcador *neo* acaban eliminados por la acción de *Flpo*. Obsérvese que esto no es seleccionable, por lo que será necesario el análisis clonal en este punto. Esto permitirá confirmar la yuxtaposición del inserto humano 2 con el humano 1 y otros esfuerzos de validación.

En esta etapa se habrá insertado un locus humano de aproximadamente 200 kb.

La figura 7 ilustra la integración del siguiente vector con inserto grande en el locus IgH de ratón. A continuación se retira el casete *pu-Δ-TK*, como en la figura 4. El proceso puede repetirse para incorporar otros BAC.

La figura 8 ilustra la construcción final predicha en las células ES.

Las figuras 9 a 18 proporcionan un mayor detalle de este proceso.

Ejemplo 2

En otro procedimiento de la invención se puede emplear la recombinación específica de sitio. La recombinación específica de sitio (SSR, por su nombre en inglés) se ha utilizado ampliamente en los últimos 20 años para la integración de transgenes en locus cromosómicos concretos. La SSR implica la recombinación entre secuencias de ADN homólogas.

La primera generación de integración cromosómica basada en SSR implicó la recombinación entre (i) un único sitio de integración por recombinación (RT, por su nombre en inglés), tal como loxP o FRT, en un plásmido transfectado con (ii) un sitio RT cromosómico proporcionado por una integración anterior. Un problema importante con esta estrategia es que las inserciones son poco frecuentes ya que la escisión siempre es más eficaz que la inserción. Se introdujo una segunda generación de SSR llamada RMCE (intercambio de casete mediado por recombinasa) por Schlake y Bode en 1994 (Schlake, T.; J. Bode (1994). «Use of mutated FLP-recognition-target-(FRT)-sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci». *Biochemistry* 33: 12746-12751). Su método se basa en utilizar dos RT heteroespecíficos e incompatibles en el plásmido transfectado que pueden recombinarse con sitios RT compatibles en el cromosoma, lo que da lugar al cambio de una pieza de ADN por otra, o a un intercambio de casete. Esta estrategia se ha explotado con éxito en muchísimas integraciones cromosómicas eficaces, entre ellas, la integración de insertos de BAC de más de 50 kb (Wallace, H. A. C. et al. (2007). «Manipulating the mouse genome to engineering precise functional syntenic replacements with human sequence». *Cell* 128: 197-209; Prosser, H. M. et al. (2008). «Mosaic complementation demonstrates a regulatory role for myosin VIIa in actin dynamics of Stereocilia». *Mol. Cell. Biol.* 28: 1702-12).

El tamaño de inserto más grande que admite un BAC es de aproximadamente 300 kb y, por lo tanto, esto coloca un límite superior al tamaño del casete para RMCE.

En la presente invención utilizamos una nueva técnica basada en la SSR llamada RMCE secuencial (SRMCE, por su nombre en inglés), que permite la inserción continua de insertos de BAC en el mismo locus.

5 El procedimiento comprende las etapas de

1 Inserción del ADN que forma parte de un casete de iniciación (también llamado una zona de integración en la presente memoria) en el genoma de una célula;

2 Inserción de un primer fragmento de ADN en el sitio de inserción, en donde el primer fragmento de ADN comprende una primera porción de un ADN de humano y una primera porción de vector que contiene un primer
10 marcador de selección o que genera un marcador de selección tras la inserción;

3 Retirada de parte del ADN del vector;

4 Inserción de un segundo fragmento de ADN en la porción del vector del primer fragmento de ADN, en donde el segundo fragmento de ADN contiene una segunda porción del ADN de humano y una segunda porción de vector, en donde la segunda porción de vector contiene un segundo marcador de selección, o que genera un segundo
15 marcador de selección tras la inserción;

5 Retirada de todo ADN de vector para permitir que el primero y el segundo fragmentos de ADN humanos formen una secuencia contigua; y

6 Repetición de las etapas de inserción de una parte del ADN de V(D)J de humano y retirada del ADN del vector, cuando sea necesario, para producir una célula con toda o parte de la región VDJ o VJ de humano suficiente
20 para ser capaz de generar un anticuerpo quimérico junto con una región constante del hospedador,

en donde la inserción de al menos un fragmento de ADN utiliza la recombinación específica de sitio.

En un aspecto específico, la estrategia utiliza tres sitios loxP incompatibles y heteroespecíficos. El procedimiento comprende las etapas que siguen, y que se ilustran en las figuras 22 a 26:

25 1. Reconocimiento de una zona de integración en el locus definido. Un vector de entrada que contiene un minigén de HPRT flanqueado por las ITR de piggyBac (PB) invertidas se integra en la región definida (por ejemplo, una región entre IgHJ y Eμ o IgKJ y Ek o IgLC1 y Eλ3-1) para servir de zona de integración para la inserción del BAC. El minigén de HPRT está comprendido por dos exones sintéticos y el intrón asociado. El exón de HPRT en 5' está flanqueado por dos sitios loxP heteroespecíficos e incompatibles (un sitio es de tipo silvestre y el otro es un sitio mutado, lox5171) en orientación inversa el uno respecto al otro (figura 22). Estos dos sitios loxP proporcionan sitios de recombinación para la inserción del BAC mediante RMCE.

30 2. Inserción del primer BAC modificado en la zona de integración reconocida. El primer BAC tiene un tramo del ADN a insertar en el genoma flanqueado por las modificaciones introducidas mediante ingeniería genética. La modificación en 5' (loxP — gen *neo* — lox2272 — promotor de PGK — 5'-LTR de PB) y la modificación en 3' (3'-LTR de PB — gen *puroΔTK* — lox5171) se describen en la figura 23 junto con las orientaciones relativas de los sitios lox y las LTR de PB. Con la expresión transitoria de CRE desde un vector coelectroporado, la secuencia de ADN se insertaría en el locus definido mediante la RMCE. Las células en las cuales se ha producido una inserción correcta pueden seleccionarse como se describe a continuación: (i) resistencia a la puomicina (el gen *puroΔTK* ha adquirido un promotor [«PGK»] que estaba en la zona de integración), (ii) resistencia a 6TG (el minigén de HPRT está interrumpido) y (iii) resistencia a G418 (selecciona cualquier inserción gracias a la disposición de la región 5' de PGK-neo). Puede utilizarse cualquier combinación de estas formas de selección. La resistencia a G418 y 6TG selecciona las integraciones correctas en el extremo 5' mientras que la resistencia a la puomicina selecciona las integraciones correctas en el extremo 3'.
35 40

45 3. Curación (retirada) de la modificación en 3' de la primera inserción. Un primer BAC insertado correctamente da lugar a que el extremo 3' tenga un gen *puroΔTK* flanqueado por las LTR de PB invertidas (figura 24), esencialmente una estructura de transposón correcta. A continuación, este transposón puede retirarse mediante la expresión transitoria de la transposasa de piggyBac (desde un vector electroporado). Las células con el acontecimiento de escisión correcto pueden seleccionarse mediante resistencia al FIAU: esto es, no hay actividad timidina cinasa del gen *puroΔTK*. Esto retira completamente la modificación en 3' sin dejar nucleótidos de más.
50

4. Inserción de un segundo BAC modificado en el extremo 5' de la primera inserción. El segundo BAC tiene un tramo de ADN a insertar en el genoma (normalmente se pretende que sea contiguo con el ADN insertado

con el primer BAC) flanqueado por modificaciones introducidas por ingeniería genética. La modificación en 5' (loxP — porción 5' del minigén de HPRT — lox5171 — promotor de PGK — 3'-LTR de PB) y la modificación en 3' (3'-LTR de PB — puroΔTK — lox2272) se describe en la figura 25 junto con las orientaciones relativas de los sitios de lox y las LTR de PB. Con la expresión transitoria de CRE desde un vector coelectroporado, la secuencia de ADN se insertaría en el locus mediante RMCE. Las células en las cuales se ha producido una inserción correcta pueden seleccionarse del siguiente modo: (i) resistencia a HAT (el minigén de HPRT se reconstruye mediante un acontecimiento de inserción correcto, a saber: las estructuras exónicas en 3' y 5' se ponen juntas) y (ii) resistencia a la puromicina (el gen *puroΔTK* ha adquirido un promotor -«PGK»- que estaba en la zona de integración).

5. Curación (retirada) de la modificación en 3' de la segunda inserción. Un segundo BAC insertado correctamente da lugar al extremo 3' que tiene un gen *puroΔTK* flanqueado por las LTR de PB invertidas (figura 26) —esencialmente una estructura de transposón correcta, exactamente análoga a la consecuencia de una primera inserción satisfactoria de BAC—. Y por lo tanto, este transposón puede retirarse igualmente mediante la expresión transitoria de la transposasa de piggyBac (desde un vector electroporado). Las células con la escisión correcta pueden seleccionarse mediante resistencia a FIAU: esto es, no hay actividad timidina cinasa a partir del gen *puroΔTK*. Esto retira completamente la modificación en 3' sin dejar nucleótidos de más.
6. Después de curar la modificación en 3' de la inserción del segundo BAC, la zona de integración se convierte en una idéntica a la original. Este proceso completo, las etapas 2 hasta la 5, pueden repetirse varias veces para construir una inserción grande en el genoma. Cuando esté completa, no quedará ningún nucleótido residual que no pertenezca a la inserción deseada.

Con la inserción de un número impar de BAC en los locus de Ig, las secuencias endógenas de VDJ o VJ pueden inactivarse a través de una inversión gracias a una modificación genética del cromosoma como la descrita a continuación (véanse las figuras 27 a 29):

1. Inserción de un casete «volteador» en una región en 5' que está a entre 10 y 40 megabases de la VDJ o VJ endógena. El vector volteador (3'-LTR de PB — promotor de PGK — porción en 5' del minigén de HPRT — loxP — *puroΔTK* — promotor de CAGGS — 3'-LTR de PB) se describe en la figura 27 junto con las orientaciones relativas de los sitios lox y de las LTR de PB.
2. La expresión transitoria de CRE dará lugar a la recombinación entre el sitio loxP en el casete «volteador» y el sitio loxP de la modificación en 5'. Esta modificación en 5' es como está descrito en las etapas 2 y 3 de más arriba: esencialmente, la modificación que es resultado de insertar un número impar de BAC, después de que se haya curado la modificación en 3'. Los sitios loxP están invertidos entre sí y, por lo tanto, el acontecimiento de recombinación descrito da lugar a una inversión como la descrita en la figura 28. Las células con la inversión correcta tendrán resistencia a HAT, ya que el minigén de HPRT se ha reconstruido mediante una inversión correcta.
3. Una inversión correcta también deja dos estructuras de transposón flanqueando el casete «volteador» y la modificación en 5'. Ambos pueden escindirse con la expresión transitoria de la transposasa de piggyBAC, lo que no deja ningún resto de ninguna de las modificaciones (figura 29). Las células con las escisiones correctas pueden seleccionarse como se explica a continuación: (i) resistencia a 6TG (se ha eliminado el minigén de HPRT) y (ii) resistencia a FIAU (se ha eliminado el gen *puroΔTK*). Una inversión como la descrita en los locus de Ig alejarían la región endógena IgH-VDJ o IgK-VJ de la región potenciadora de Eμ o Ek, respectivamente, y conducirían a la inactivación de las regiones endógenas IgH-VDJ o IgK-VJ.

Los procedimientos de inserción de la invención dan a conocer convenientemente uno o varios de:

Selección de ambos extremos 5' y 3' del fragmento de ADN insertado;

Curación eficaz de la modificación en 3', preferiblemente mediante la escisión de ADN mediada por transposasa;

Inactivación de la actividad endógena de IgH o IgK mediante una inversión; y

Escisión de las modificaciones, lo que no deja ningún nucleótido de más en el cromosoma.

Ejemplo 3

La demostración preliminar de la técnica se describe en la figura 30. En la figura 30, una zona de integración como la mostrada en la figura 22 se insertó en el genoma de un ratón mediante recombinación homóloga, y luego se insertó el plásmido R21 en esa zona de integración gracias a la recombinación específica de sitio mediada por CRE. El acontecimiento de inserción generó numerosas inserciones generales, 360 colonias resistentes a G418, de las cuales aproximadamente 220 tenían el inserto en el locus deseado, como se demostró por la interrupción del

minilocus de HRPT.

El vector de R21 imita los extremos en 5' y 3' del vector de inserción del primer BAC, incluidos todos los elementos de selección y sitios diana de la recombinasa. En lugar de la secuencia de los BAC, hay una pequeña secuencia de «relleno». Este vector servirá para analizar todos los principales diseños de la invención y permitirá que se analicen son facilidad los resultados, ya que se puede realizar una PCR que abarque el relleno y, por lo tanto, permite el análisis fácil de ambos extremos de la inserción. El R21 se coelectroporó con un vector de expresión de CRE en las células ES que albergan la zona de integración en el locus IgH. Se transfectaron en paralelo cuatro conjuntos de células transformadas y luego se colocaron en regímenes de selección diferentes tal y como se indica en la figura 30. La selección por G418 (expresión del gen *neo*) dio lugar al mayor número de colonias debido a que no hay ningún requisito para la inserción por la zona de integración específica. Toda integración de R21 en el genoma proporcionará la expresión de *neo*, lo que conduce a la resistencia a G418. La selección con puromicina dio lugar a un número de colonias similar a puromicina + 6TG o G418 + 6TG, lo que sugiere que el rigor de la selección con puromicina se debe a que el gen *puroΔTK* carece de promotor en el vector. La expresión de resistencia a la puromicina sólo se adquiere cuando se produce una integración cerca de un elemento promotor —en este diseño, lo más probable es la inserción específica en la zona de integración—. Estas conclusiones están apoyadas por los resultados de la PCR sobre la unión que se muestra en la figura 31.

La siguiente etapa en la invención es «curar» el extremo 3' del vector BAC integrado, lo que deja una transición ininterrumpida entre la inserción y el genoma flanqueante. Demostramos que se produjo esta curación mediante la expansión de uno de los clones anteriores (R21 insertado en la zona de integración) y la expresión de la recombinasa de piggyBAC en este clon mediante la transfección de un plásmido que la expresa. Se utilizó el FIAU para seleccionar colonias en las cuales se escindió la modificación en 3': esto es, a través de la pérdida del elemento «PGK — *puroΔTK*» entre las repeticiones terminales de piggyBAC. En una transfección de 10^6 células se obtuvieron 50 de tales clones; se analizó la estructura genómica esperada en 6 de ellos. La curación satisfactoria permitía obtener una PCR positiva entre el conjunto de cebadores marcado con «3» en la figura 32. De los 6 clones, 4 tuvieron escisiones correctas, 1 clon se quedó con la configuración original y otro más tenía una delección.

Estos datos demuestran que se insertó repetidamente ADN en una zona de integración en un locus genómico definido mediante las estrategias descritas más arriba.

Ejemplo 4

El ejemplo 3 demostró que el diseño de la invención reivindicada era capaz de proporcionar la inserción de un vector problema en el genoma en una posición definida, en este caso el vector de R21 en el locus de IgH de ratón. El uso del medio de selección adecuado y la expresión de la recombinasa cre dieron lugar a una alteración genómica con la estructura predicha.

Los mismos elementos diseñados que se describen en esta invención se colocaron en los extremos en 5' y 3' de un inserto de BAC. Dicho inserto comprendía secuencias humanas del locus IgH y tenía aproximadamente 166 kb. Este BAC modificado genéticamente se introdujo por electroporación, junto con un ADN plasmídico que expresaba cre, en las células ES de ratón que albergan la zona de integración en el locus IgH de ratón. La población de células transfectadas se hizo crecer en el medio con puromicina para seleccionar las inserciones correctas.

Se aislaron los siete clones resultantes y se analizaron con más detalle. El acontecimiento de recombinación esperado y la estructura resultante se describen en la figura 33. Basándose en los datos del experimento de R21 descrito en el ejemplo 3, se esperaba una selección rigurosa de los clones correctos cuando se seleccionó la población transfectada en el medio con puromicina. Esto es porque la región que codifica la resistencia a la puromicina requiere un elemento promotor, y éste lo suministra preferiblemente la zona de integración después de la recombinación. Por consiguiente, la mayoría de los 7 clones aislados tenían la inserción correcta en el genoma en la zona de integración, tal y como se determinó mediante PCR diagnóstica. Los cebadores para diagnosticar una inserción correcta se describen en la figura 33. Las uniones correctas están presentes en el genoma si se amplifica un fragmento de 610 pb entre los cebadores «A» y «X» y se amplifica un fragmento de 478 pb entre los cebadores «Y» y «B» (figuras 33 y 34). Obsérvese que hay fragmentos amplificados entre los cebadores «A» y «1» y entre los cebadores «2» y «B», lo que indica la presencia de un genoma parental (es decir, únicamente la zona de integración). Estos se deben a que las células parentales presentes en el interior en las colonias de células en selección con puromicina se escapan a dicha selección debido a la geometría de una colonia. Después de hacer pases de la colonia por medios que contienen puromicina, estos fragmentos de unión originales desaparecen, lo que indica que las células parentales han sido retiradas de la población. Además, todos los clones resultaron ser resistentes a 6TG como se esperaba si el gen HPRT está inactivado por el acontecimiento de inserción correcto.

Estos datos indican que la estrategia descrita para insertar grandes partes de los locus humanos de Ig en las posiciones definidas en el genoma de ratón permitirán la construcción de un ratón con numerosas regiones variables de las regiones de Ig de humano por delante de las regiones constantes de ratón tal y como está descrito.

En la presente memoria se describen:

A Un mamífero no humano cuyo genoma comprende:

(a) una serie de regiones V de IgH de humano, una o varias regiones D de humano y una o varias regiones J de humano por delante de la región constante de mamífero no humano hospedador; y

5 (b) opcionalmente una o varias regiones V de la cadena ligera kappa de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera kappa de humano por delante de la región constante kappa de mamífero no humano hospedador y/o una o varias regiones V de la cadena ligera lambda de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera lambda de Ig de humano por delante de la región constante de lambda de mamífero no humano hospedador;

10 en donde el mamífero no humano es capaz de producir un repertorio de anticuerpos quiméricos, o cadenas pesadas y ligeras quiméricas, que tienen una región constante de mamífero no humano y una región variable de humano.

B Un mamífero no humano cuyo genoma comprende

15 (a) una serie de regiones V de la cadena ligera kappa de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera kappa de Ig de humano por delante de la región constante de kappa de mamífero no humano hospedador; y/o una serie de regiones V de la cadena ligera lambda de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera de Ig de humano por delante de la región constante de lambda de mamífero no humano hospedador; y

(b) opcionalmente una o varias regiones V de IgH de humano, una o varias regiones D de humano y una o varias regiones J de humano por delante de la constante de mamífero no humano hospedador;

20 en donde el mamífero no humano es capaz de producir un repertorio de anticuerpos quiméricos, o cadenas pesadas o ligeras quiméricas, que tienen una región constante de mamífero no humano y una región variable de humano.

C Una célula de mamífero no humano cuyo genoma comprende

(a) una serie de regiones V de IgH de humano, una o varias regiones D de humano y una o varias regiones J de humano por delante de la región constante de mamífero no humano hospedador y

25 (b) opcionalmente una o varias regiones V de la cadena ligera kappa de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera kappa de Ig de humano por delante de la región constante kappa de mamífero no humano hospedador, y/o una o varias regiones V de la cadena ligera lambda de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera lambda de Ig de humano por delante de la región constante de lambda de mamífero no humano hospedador.

D Una célula de mamífero no humano cuyo genoma comprende

30 (a) una serie de regiones V de la cadena ligera kappa de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera kappa de Ig de humano por delante de la región constante kappa de mamífero no humano hospedador y/o una serie de regiones V de la cadena ligera lambda de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera lambda de Ig de humano por delante de la región constante de lambda de mamífero no humano hospedador; y

35 (b) opcionalmente una o varias regiones V de IgH de humano, una o varias regiones D de humano y una o varias regiones J de humano por delante de la región constante de mamífero no humano hospedador.

E Una célula de acuerdo con el enunciado C o D que es una célula ES, una célula madre hematopoyética u otra célula capaz de desarrollarse en un mamífero no humano capaz de producir un repertorio de anticuerpos o cadenas de anticuerpos que son quiméricos, teniendo dichos anticuerpos o cadenas quiméricos una región constante de mamífero no humano y una región variable de humano.

40 F Una célula de acuerdo con el enunciado C o D que es una célula ES, una célula madre hematopoyética u otra célula capaz de contribuir a tejidos y órganos de un mamífero no humano que es capaz de producir un repertorio de anticuerpos o cadenas de anticuerpos que son quiméricos, teniendo dichos anticuerpos o cadenas quiméricos una región constante de mamífero no humano y una región variable de humano.

45 G Una célula o mamífero de acuerdo con el enunciado A-F en donde el genoma de la célula o mamífero se modifica para evitar o reducir la expresión de anticuerpos completamente específicos de la especie de hospedador.

H Una célula o mamífero de acuerdo con los enunciados A-G que comprende un ADN de la región variable de humano insertado de al menos una cadena pesada de humano y ligera de humano.

I Una célula o mamífero de acuerdo con el enunciado H en donde la célula o mamífero son homocigotos en

uno, dos o los tres locus de inmunoglobulina para el ADN que codifica una cadena de anticuerpo quimérica.

J Una célula o mamífero de acuerdo con el enunciado H en donde la célula o mamífero son heterocigotos en uno, dos o los tres locus de inmunoglobulina para el ADN que codifica una cadena pesada o ligera quiméricas.

5 K Una célula o mamífero de acuerdo con cualquiera de los enunciados A-J en donde la inserción del ADN de la cadena pesada de humano se localiza por delante de la región constante de la cadena pesada de mamífero no humano, y/o la inserción del ADN de la cadena ligera de humano es por delante de una región constante de la cadena ligera de mamífero no humano, de tal manera que se puede producir una cadena pesada o ligera quiméricas en la célula o el mamífero.

10 L Una célula o mamífero de acuerdo con el enunciado K en donde la inserción del ADN de humano se lleva a cabo entre la región constante de mamífero no humano y la última región J de mamífero no humano, 3'.

M Una célula o mamífero de acuerdo con cualquier enunciado precedente en donde el genoma de la célula no comprende ADN de la región constante de otra célula u organismo.

N Una célula de acuerdo con los enunciados B-M que está inmortalizada.

15 O Un procedimiento para producir un mamífero o célula no humanos, comprendiendo el procedimiento insertar en un mamífero o célula no humanos el genoma;

(a) una serie de regiones V de IgH de humano, una o varias regiones D de humano y una o varias regiones J de humano por delante de la región constante de mamífero no humano hospedador; y

20 (b) opcionalmente una o varias regiones V de la cadena ligera kappa de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera kappa de Ig de humano por delante de la región constante de kappa de mamífero no humano hospedador y una o varias regiones V de la cadena ligera lambda de Ig de humano y/o una o varias regiones J de la cadena ligera lambda de Ig de humano por delante de la región constante de lambda de mamífero no humano hospedador; respectivamente.

25 siendo la inserción de tal manera que el mamífero no humano es capaz de producir un repertorio de anticuerpos o cadenas de anticuerpos pesadas y ligeras quiméricas que tienen una región constante de mamífero no humano y una región variable de humano, en donde las etapas (a) y (b) se pueden llevar a cabo en cualquier orden y cada una de las etapas (a) y (b) se puede llevar a cabo por etapas o en una sola etapa.

P Un procedimiento para producir un mamífero o célula no humanos, comprendiendo el procedimiento insertar en un mamífero o célula no humanos el genoma.

30 (a) una serie de regiones V de la cadena ligera kappa de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera kappa de Ig de humano por delante de la región constante de kappa de mamífero no humano hospedador y/o una serie de regiones V de la cadena ligera lambda de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera lambda de Ig de humano por delante de la región constante lambda de mamífero no humano hospedador; y

35 (b) opcionalmente una o varias regiones V de IgH de humano, una o varias regiones D de humano y una o varias regiones J de humano por delante de la constante de mamífero no humano hospedador;

siendo la inserción de tal manera que el mamífero no humano sea capaz de producir un repertorio de anticuerpos o cadenas pesadas o ligeras de anticuerpos quiméricas que tienen una región constante de mamífero no humano y una región variable de humano, en donde las etapas (a) y (b) se pueden llevar a cabo en cualquier orden y cada una de las etapas (a) y (b) se puede llevar a cabo por etapas o en una sola etapa.

40 Q Un procedimiento de acuerdo con el enunciado O o P en donde la célula es una célula ES.

R Un procedimiento de acuerdo con el enunciado O-Q en donde la inserción de las regiones VDJ o VJ humanas por delante de la región constante de mamífero no humano hospedador se logra mediante la inserción por etapas de múltiples fragmentos por recombinación homóloga.

45 S Un procedimiento de acuerdo con los enunciados O-R en donde uno o varios eventos de inserción utilizan la recombinación específica del sitio.

T Un procedimiento para producir un anticuerpo o cadena pesada o ligera de anticuerpo específicos para un antígeno deseado, comprendiendo el procedimiento la inmunización de un mamífero no humano como se establece en el enunciado 1 o 2 con el antígeno deseado y la recuperación del anticuerpo o cadena de anticuerpo o la recuperación de una célula productora del anticuerpo o de la cadena pesada o ligera.

U Un procedimiento para producir un anticuerpo o una cadena de anticuerpo completamente humanizados que comprende inmunizar un mamífero no humano de acuerdo con la reivindicación T y a continuación remplazar la región constante de mamífero no humano de un anticuerpo específicamente reactivo con el antígeno por una región constante humana convenientemente mediante manipulación genética del ácido nucleico que codifica el anticuerpo.

- 5 V Un procedimiento, célula o mamífero como se reivindica en los enunciados A-U en donde una secuencia de ADN de la región codificante humana está en una disposición funcional con una secuencia de control de mamífero no humano, de manera que la transcripción del ADN humano es controlada por la secuencia de control de mamífero no humano.

W Un anticuerpo o cadena de anticuerpo humanizados producidos de acuerdo con el enunciado T o U.

- 10 X El uso de un anticuerpo o cadena humanizados producidos de acuerdo con el enunciado T o U en medicina.

Y Un anticuerpo o cadena de anticuerpo humanizados producidos de acuerdo con el enunciado T o U para su uso en medicina.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir un roedor capaz de producir un repertorio de anticuerpos o cadenas pesadas de anticuerpos quiméricos, comprendiendo el procedimiento:

5 insertar en un genoma de una célula de roedor;

(a) una serie de regiones V de IgH de humano, una o varias regiones D de humano y una o varias regiones J de humano por delante de la región constante del roedor hospedador; y

10 (b) opcionalmente una o varias regiones V de la cadena ligera kappa de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera kappa de Ig de humano por delante de la región constante de kappa de mamífero roedor hospedador y/o una o varias regiones V de la cadena ligera lambda de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera lambda de Ig de humano por delante de la región constante de lambda de mamífero roedor hospedador; respectivamente.

siendo la inserción de tal manera que el roedor es capaz de producir un repertorio de anticuerpos o cadenas pesadas de anticuerpos quiméricos que tienen una región constante de roedor y una región variable de humano,

15 en donde las etapas (a) y (b), cuando están presentes ambas, se pueden llevar a cabo en cualquier orden,

en donde, uno o varios eventos de inserción utilizan la recombinación específica del sitio,

20 en donde el procedimiento de inserción comienza en un sitio en el que se ha insertado una casete de iniciación en el genoma de la célula de roedor, tal como una célula ES, y en donde la inserción de un primer fragmento de ADN en la casete de iniciación está seguida de la inserción de un segundo fragmento de ADN en una porción del primer fragmento de ADN,

y en donde la inserción del ADN humano se realiza entre la región constante de roedor y la última región J de roedor, 3'.

2. Un procedimiento para producir un roedor capaz de producir un repertorio de anticuerpos o cadenas ligeras de anticuerpos quiméricos, comprendiendo el procedimiento insertar en un genoma de una célula de roedor;

25 (a) una serie de regiones V de la cadena ligera kappa de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera kappa de Ig de humano por delante de la región constante kappa del roedor hospedador; y/o una serie de regiones V de la cadena ligera lambda de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera de Ig de humano por delante de la región constante de lambda de roedor hospedador; y

30 (b) opcionalmente una o varias regiones V de IgH de humano, una o varias regiones D de humano y una o varias regiones J de humano por delante de la región constante del roedor hospedador;

siendo la inserción de tal manera que el roedor es capaz de producir un repertorio de anticuerpos o cadenas ligeras de anticuerpos quiméricos que tienen una región constante de roedor y una región variable de humano,

en donde las etapas (a) y (b), cuando están presentes ambas, se pueden llevar a cabo en cualquier orden,

en donde uno o varios eventos de inserción utilizan la recombinación específica del sitio

35 en donde el procedimiento de inserción comienza en un sitio en el que se ha insertado una casete de iniciación en el genoma de la célula de roedor, tal como una célula ES; y en donde la inserción de un primer fragmento de ADN en la casete de iniciación está seguida de la inserción de un segundo fragmento de ADN en una porción del primer fragmento de ADN,

40 y en donde la inserción del ADN humano se realiza entre la región constante de roedor y la última región J de roedor, 3'.

3. Un procedimiento para producir una célula de roedor, comprendiendo el procedimiento insertar en un genoma de una célula de roedor; (a) una serie de regiones V de IgH de humano, una o varias regiones D de humano y una o varias regiones J de humano por delante de la región constante del roedor hospedador; y (b) opcionalmente una o varias regiones V de la cadena ligera kappa de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera kappa de Ig de humano por delante de la región constante kappa del mamífero roedor hospedador y/o una o varias regiones V de la cadena ligera lambda de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera lambda de Ig de humano por delante de la región constante lambda del mamífero roedor hospedador; respectivamente, en donde las etapas (a) y (b), cuando están ambas presentes, se pueden llevar a cabo en cualquier orden, en donde uno o varios

eventos de inserción utilizan la recombinación específica del sitio, en donde el procedimiento de inserción comienza en el sitio en el que se ha insertado una casete de iniciación en el genoma de la célula de roedor, tal como una célula ES, y en donde la inserción de un primer fragmento de ADN en la casete de iniciación está seguida por la inserción de un segundo fragmento de ADN en una porción del primer fragmento de ADN, y en donde la inserción del ADN humano se realiza entre la región constante de roedor y la última región J de roedor, 3'.

4. Un procedimiento para producir una célula de roedor, comprendiendo el procedimiento insertar en un genoma de una célula de roedor; (a) una serie de regiones V de la cadena ligera kappa de Ig de humano, y una o varias regiones J de la cadena ligera kappa de Ig de humano por delante de la región constante kappa del roedor hospedador y/o una serie de regiones V de la cadena ligera lambda de Ig de humano y una o varias regiones J de la cadena ligera lambda de Ig de humano por delante de la región constante lambda del roedor hospedador; y (b) opcionalmente una o varias regiones V de IgH humana, una o varias regiones D humanas y una o varias regiones J humanas por delante de la región constante de roedor hospedador; en donde las etapas (a) y (b), cuando están ambas presentes, se pueden llevar a cabo en cualquier orden, en donde uno o varios eventos de inserción utilizan la recombinación específica del sitio, en donde el procedimiento de inserción comienza en el sitio en el que se ha insertado una casete de iniciación en el genoma de la célula de roedor, tal como una célula ES; y en donde la inserción de un primer fragmento de ADN en la casete de iniciación está seguida por la inserción de un segundo fragmento de ADN en una porción del primer fragmento de ADN, y en donde la inserción del ADN humano se realiza entre la región constante de roedor y la última región J de roedor, 3'.

5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1-4, en donde la recombinación específica del sitio es RMCE.

6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la RMCE es una RMCE secuencial (SRMCE).

7. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende las etapas de:

i. inserción de ADN que forma una casete de iniciación en el genoma de una célula;

ii. inserción de un primer fragmento de ADN en el sitio de inserción, comprendiendo el primer fragmento de ADN una primera porción de una región de ADN de VDJ o VJ humana y conteniendo una primera porción del vector un primer marcador seleccionable o generando un marcador seleccionable después de la inserción;

iii. opcionalmente eliminación de parte del ADN del vector;

iv. inserción de un segundo fragmento de ADN en la porción de vector del primer fragmento de ADN, conteniendo el segundo fragmento de ADN una segunda porción de ADN de VDJ o VJ humano y una segunda porción del vector, conteniendo la segunda porción del vector un segundo marcador seleccionable, o generando un segundo marcador seleccionable después de la inserción;

v. eliminación de cualquier ADN del vector para permitir que el primer y segundo fragmentos de ADN humano formen una secuencia contigua; y

vi. repetición de las etapas de inserción de una parte del ADN de V(D)J humano y eliminación del ADN del vector, según sea necesario, para producir una célula con toda o parte de la región VDJ o VJ humana suficiente para ser capaz de generar un anticuerpo quimérico junto con una región constante del hospedador.

8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en donde se utilizan tres sitios loxP heteroespecíficos e incompatibles.

9. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde los sitios de recombinación específicas del sitio son sitios loxP, o variantes de los mismos, o sitios FRT, o variantes de los mismos.

10. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde los sistemas de recombinasa específicos del sitio se seleccionan entre Cre-lox, y FLP/FRT, o combinaciones de los mismos.

11. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que utiliza un vector, comprendiendo el vector un inserto que comprende una región de ADN humano de algún locus VDJ o VJ humano flanqueado por ADN que no es de ese locus, y en donde el ADN flanqueante comprende uno o más marcadores seleccionables o uno o más sitios de recombinación específica del sitio.

12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el vector comprende 2 o más, tal como 3, sitios de recombinación heteroespecífica y específica del sitio incompatible.

13. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde el vector comprende una o varias

secuencias ITR (repetición terminal invertida) de trasposón.

14. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la casete de iniciación se inserta en el locus de la cadena pesada de roedor, para su uso en la inserción de ADN de la cadena pesada humana.
- 5 15. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la casete de iniciación se inserta en el locus de la cadena ligera de roedor, para su uso en la inserción de ADN de VJ de la cadena ligera humana.
16. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la casete de iniciación se inserta entre la posición 114.667.090 y 114.665.190 del cromosoma 12 de ratón (NCBI m37, Abril 2007 ENSEMBL Pelease 55.37h para la cepa C57BL/6J de ratón).
- 10 17. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el primer fragmento de la región variable humana se inserta mediante recombinación homóloga en la secuencia de esqueleto de la casete de iniciación y después el ADN de cualquier marcador de selección negativo y la casete de iniciación en el vector se eliminan con posterioridad mediante recombinación entre secuencias diana de recombinasa.
18. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el extremo 5' del inserto humano tiene una longitud mayor.
- 15 19. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la célula es una célula ES.
20. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde:
una o varias secuencias de control de roedor tal como la secuencia potenciadora se mantiene por delante de la región constante Mu de roedor, adecuadamente en su posición nativa con respecto a la distancia de la región constante; o
20 una o varias secuencias de control de roedor tal como la secuencia o las secuencias potenciadoras se mantienen por detrás de la región constante Mu de roedor, adecuadamente en su posición nativa con respecto a la distancia de la región constante; o
una secuencia de cambio de roedor, adecuadamente la secuencia de cambio endógena, se mantiene por delante de la región constante Mu de roedor, adecuadamente en su posición nativa con respecto a la
25 distancia de la región constante.
21. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la célula ES comprende una secuencia VDJ o VJ humana completa, o una porción de la misma.
22. Un procedimiento para producir un anticuerpo específico para un antígeno deseado, comprendiendo el procedimiento la inmunización de un roedor elaborado de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 o 5-21 con el
30 antígeno deseado y la recuperación del anticuerpo.
23. El procedimiento de la reivindicación 22, que comprende adicionalmente la recuperación del anticuerpo o las células que expresan el anticuerpo, y a continuación el remplazo de la región constante de mamífero no humano por una región constante de humano para producir un anticuerpo completamente humanizado.
24. El procedimiento de la reivindicación 22 o la reivindicación 23, que comprende adicionalmente generar un
35 derivado de anticuerpo quimérico del anticuerpo quimérico de la reivindicación 22 o 23.
25. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 24, en donde los anticuerpos quiméricos de la reivindicación 22 o 23 se manipulan, opcionalmente a nivel de ADN, para generar moléculas con propiedades o estructura de tipo anticuerpo seleccionadas entre:
un anticuerpo de dominio; o
40 una región variable humana con cualquier región constante de cualquier cadena pesada o ligera de la misma o diferente especie; o
una región variable humana junto con cualquier otro acompañante para fusión.
26. El procedimiento de cuna cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, que comprende adicionalmente preparar una composición farmacéutica que comprende combinar el anticuerpo, con un vehículo u otro excipiente
45 farmacéuticamente aceptable para producir la composición.
27. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 22, que comprende adicionalmente hacer crecer u obtener una célula o línea celular productoras de anticuerpo a partir de la célula de roedor, opcionalmente en donde la célula

o línea celular de anticuerpo se immortaliza mediante fusión con una célula tumoral para proporcionar una célula o línea celular productoras de anticuerpo, o mediante immortalización celular directa.

28. Un roedor generado mediante los procedimientos de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5-21.

5 29. Un roedor de acuerdo con la reivindicación 28, que comprende una secuencia VDJ o VJ humana completa o una porción de la misma.

30. Una célula de roedor aislada del roedor de la reivindicación 28 o 29, comprendiendo la célula una secuencia VDJ o VJ humana completa, o una porción de la misma.

Esqueleto básico de tres vectores

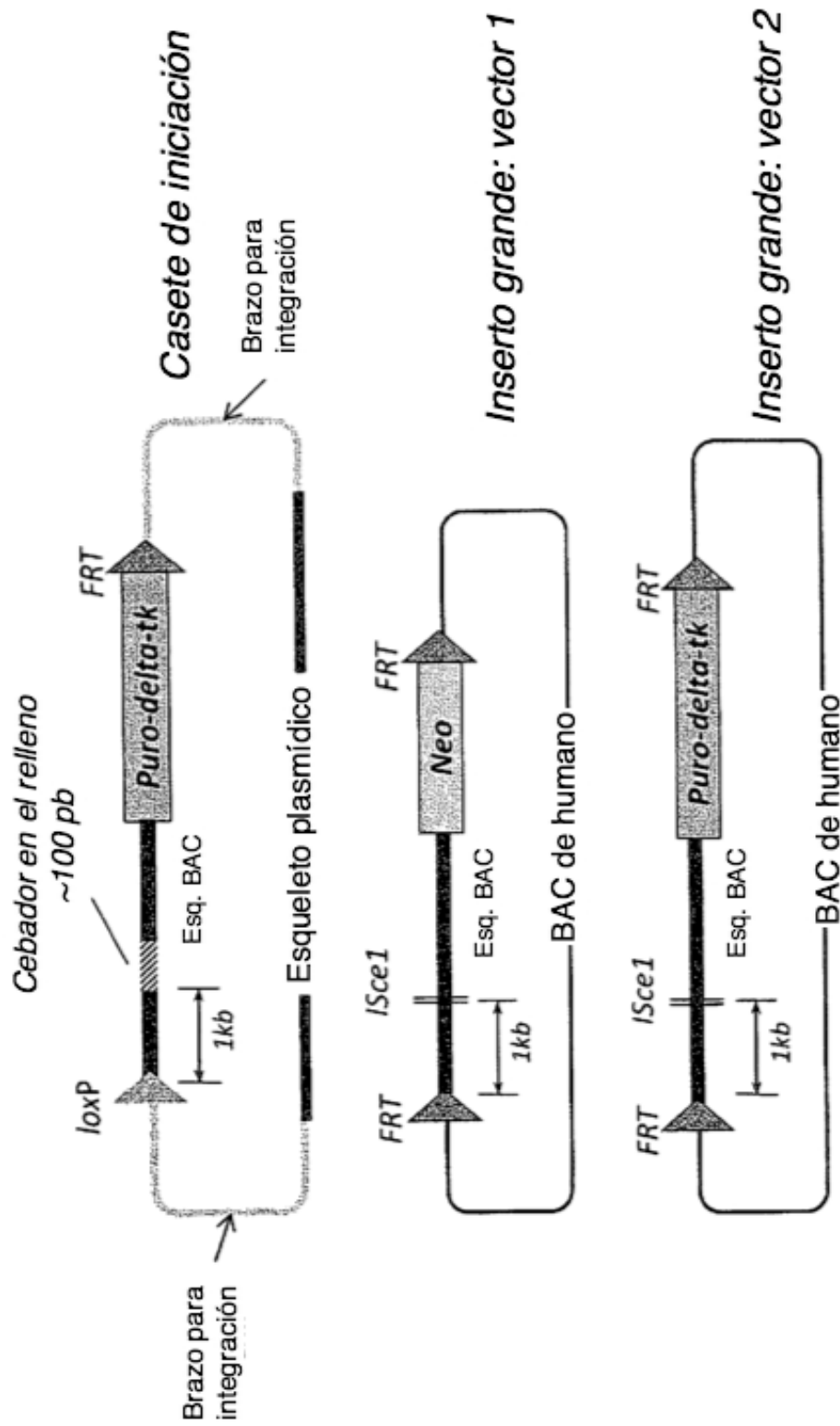
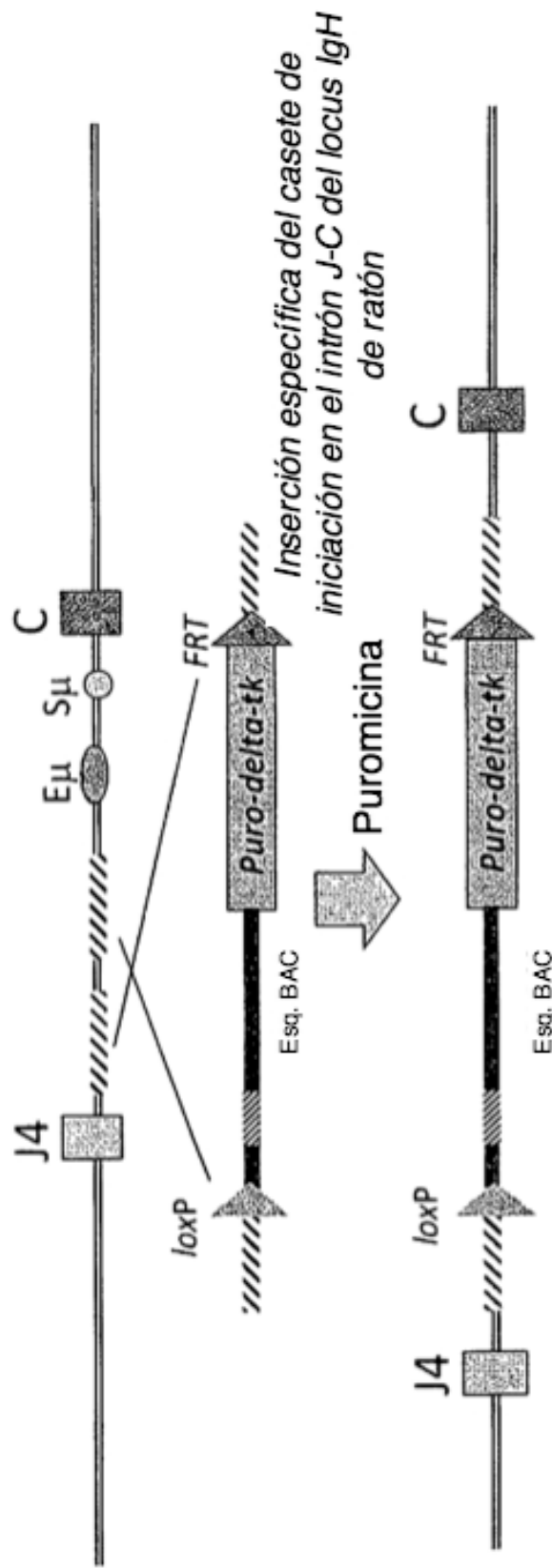


Fig. 1

Vector de iniciación/entrada: etapa 1



Validación:

1. Inserción génica estándar por LR-PCR/Southern
2. Hacer quimeras y criar en paralelo con la siguiente etapa

Fig. 2

Vector de adición: etapa 2

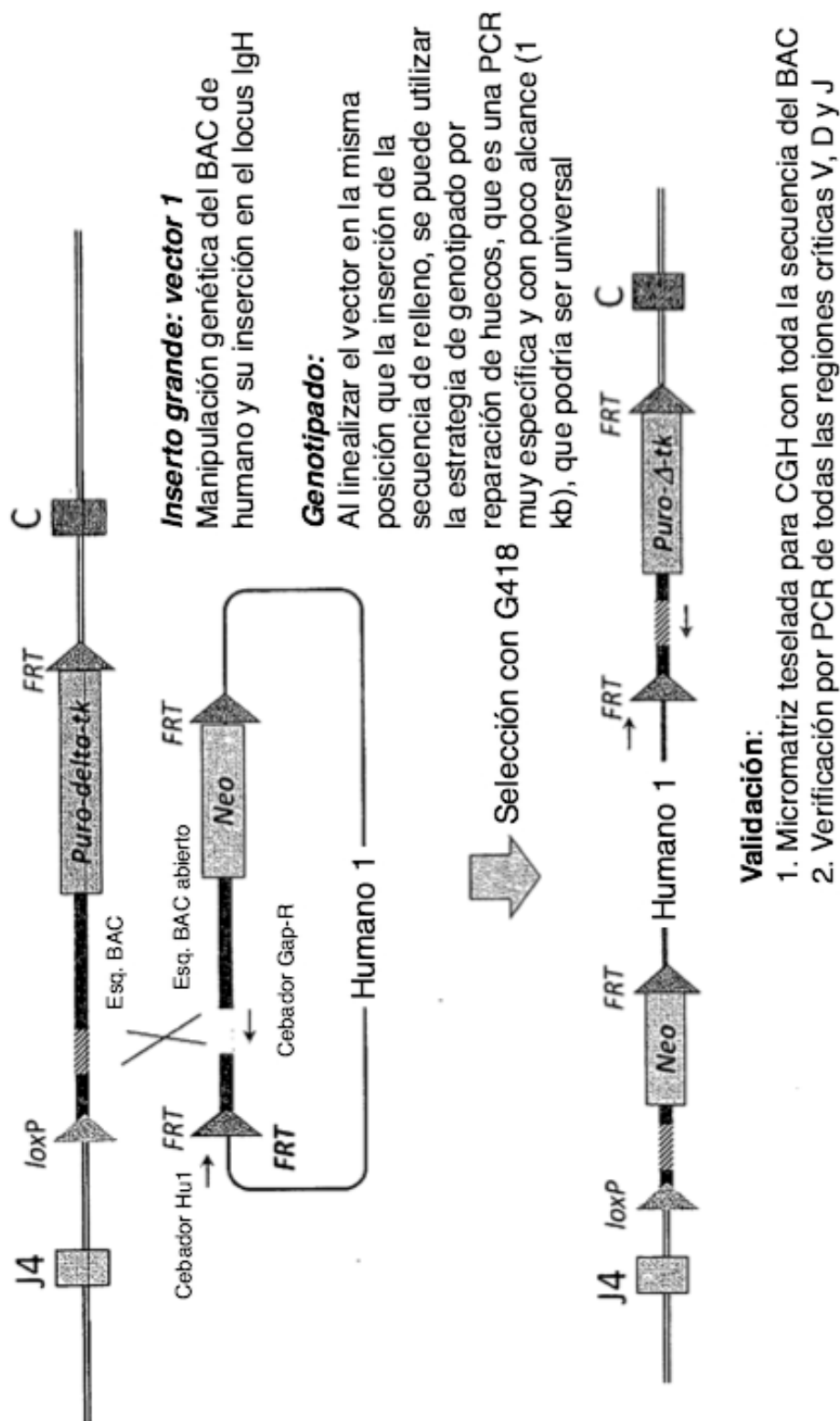


Fig. 3

Vector de adición: etapa 2

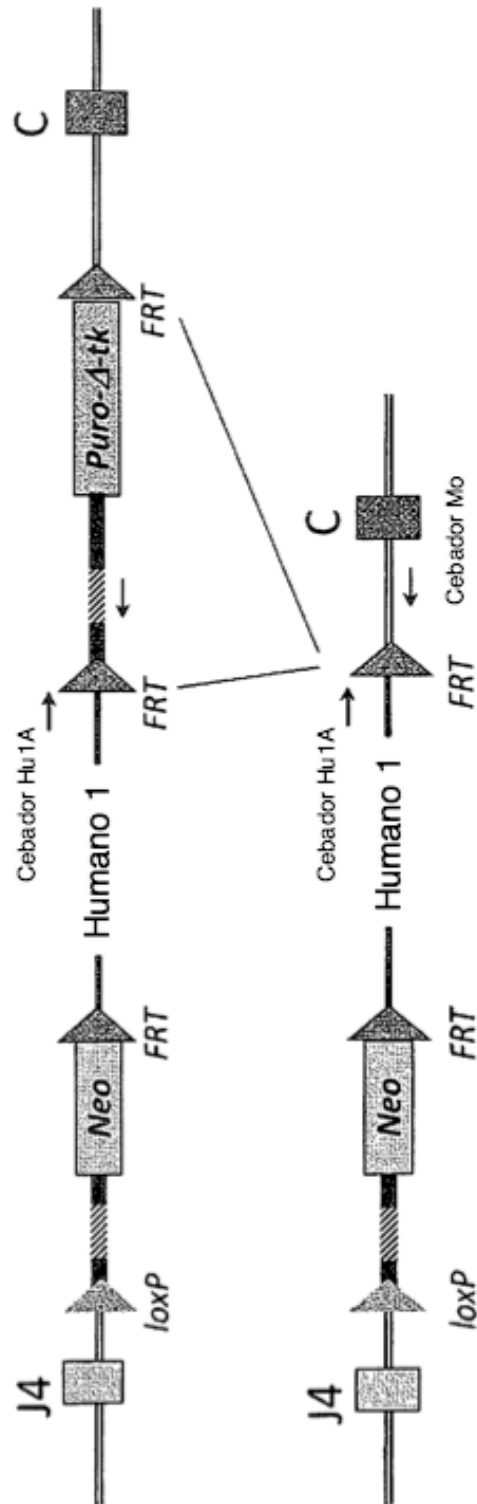


Fig. 4

Vector de adición: etapa 3A

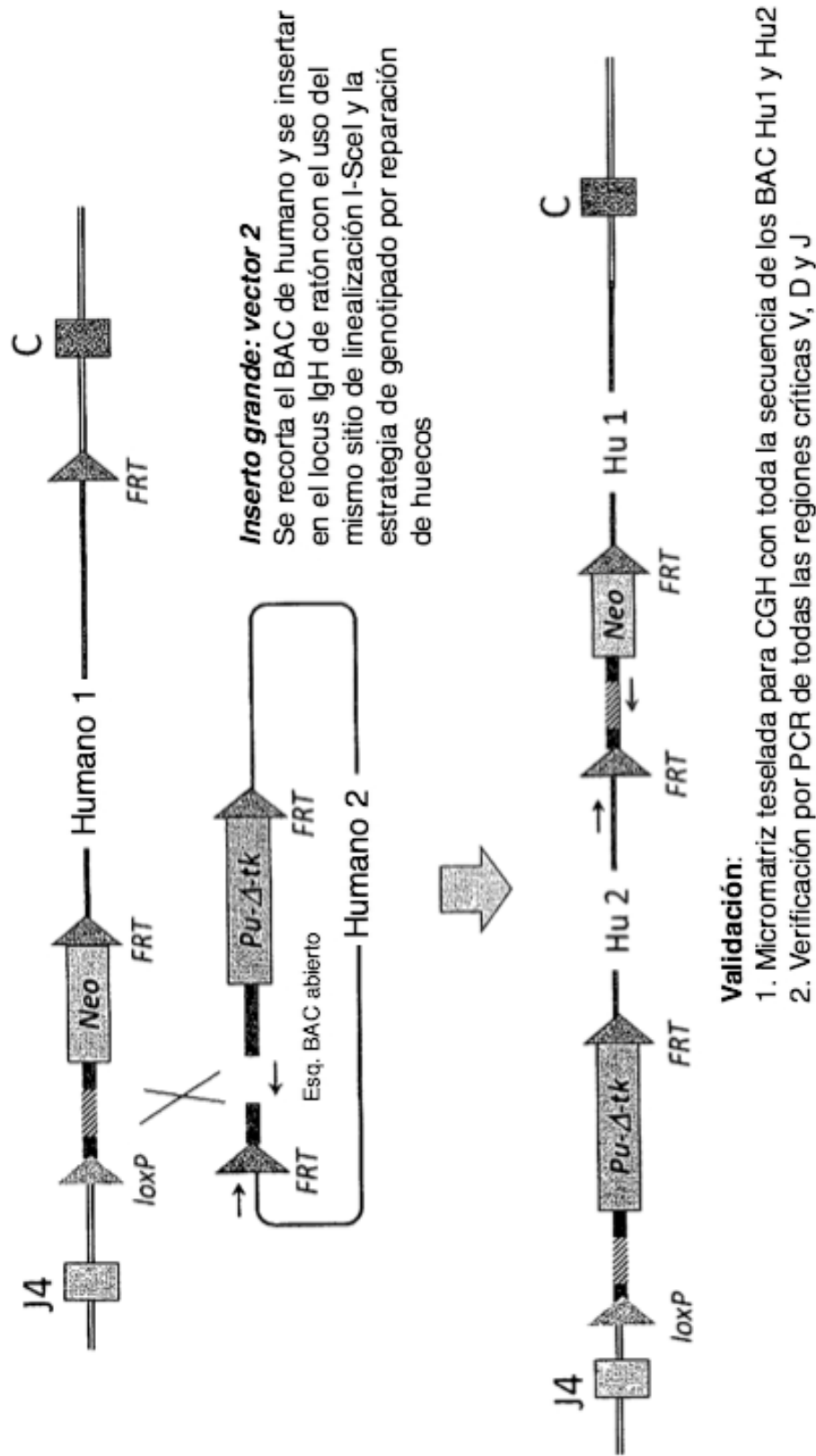


Fig. 5

Vector de adición: etapa 3B

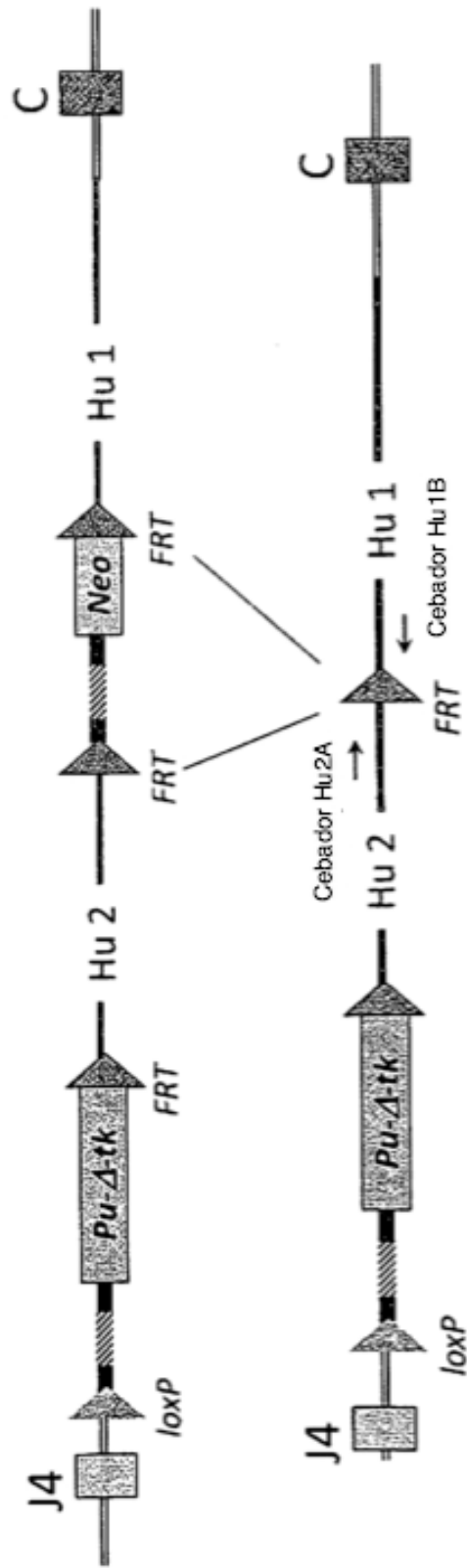


Fig. 6

Vector de adición: etapa 4

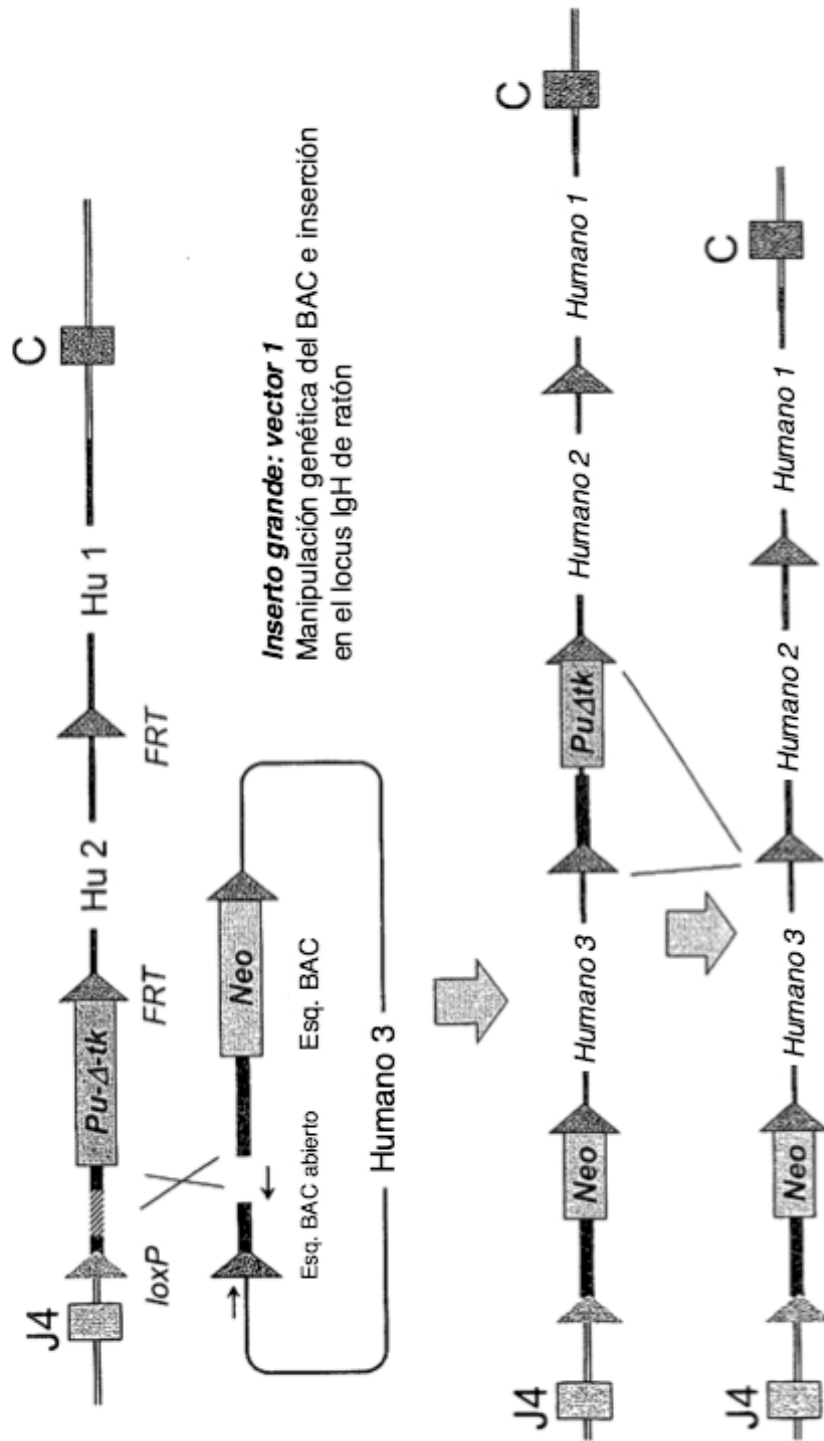


Fig. 7

Un locus *IgH* murino humanizado

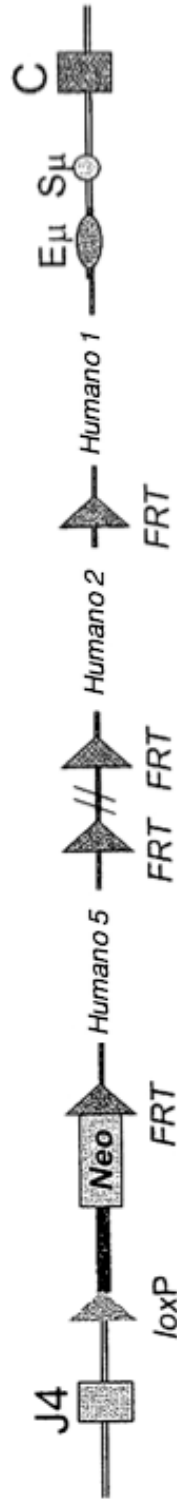
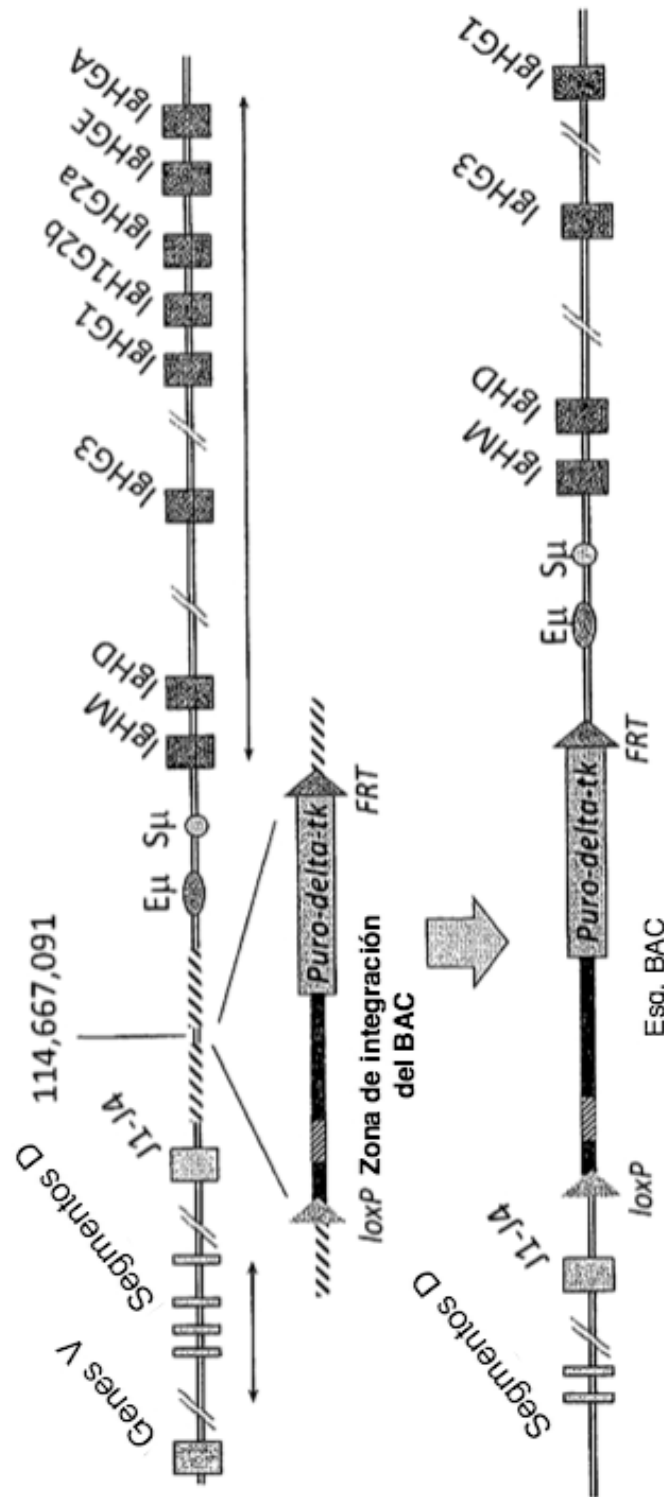


Fig. 8

Zona de integración del BAC insertada en el locus IgH



Validación:

1. Inserción génica estándar por LR-PCR/Southern
2. Hacer quimeras y cría de comprobación

Fig. 9

Inserción del 1.º BAC: etapa 1

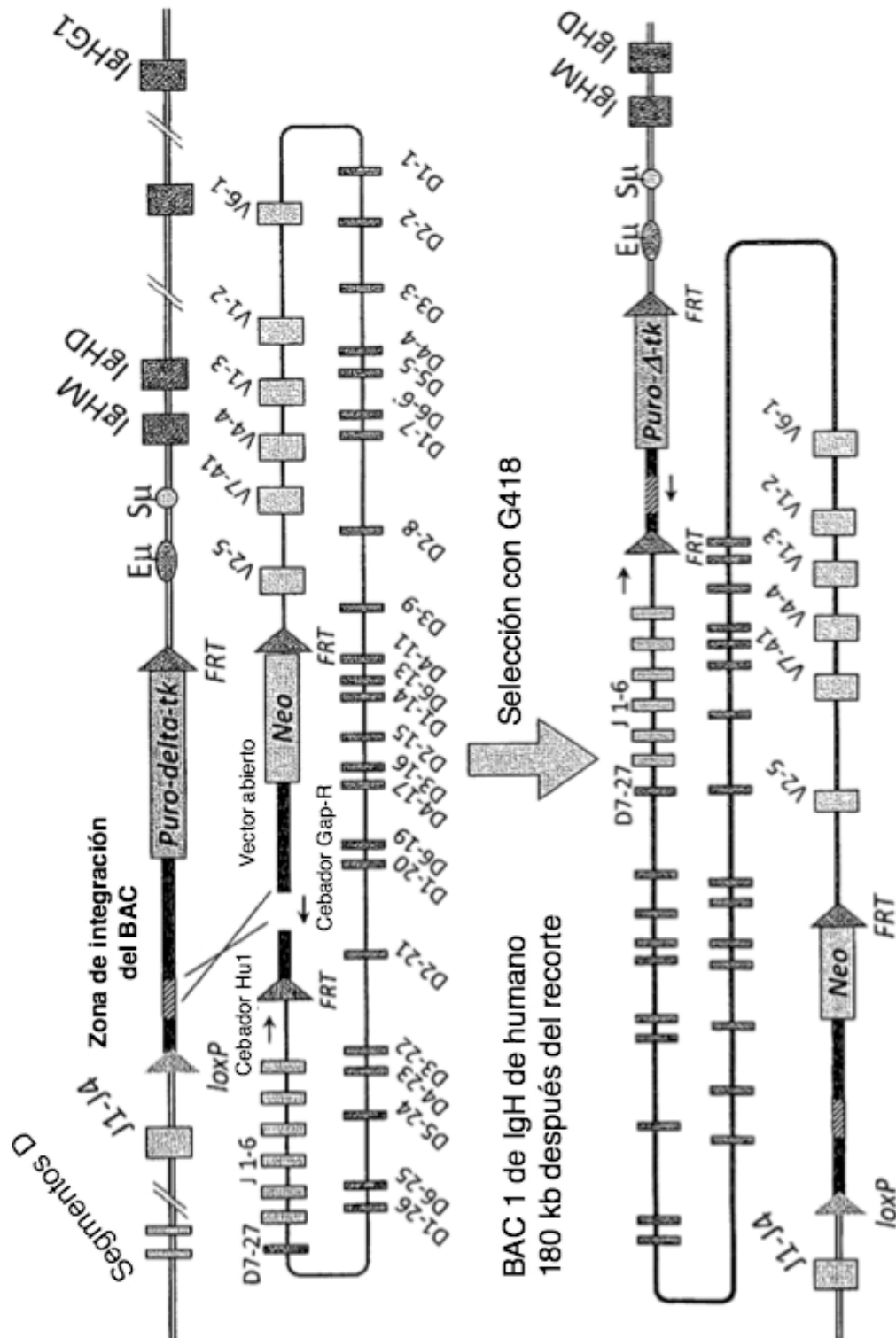


Fig. 10

Inserción del 2.º BAC: etapa 3

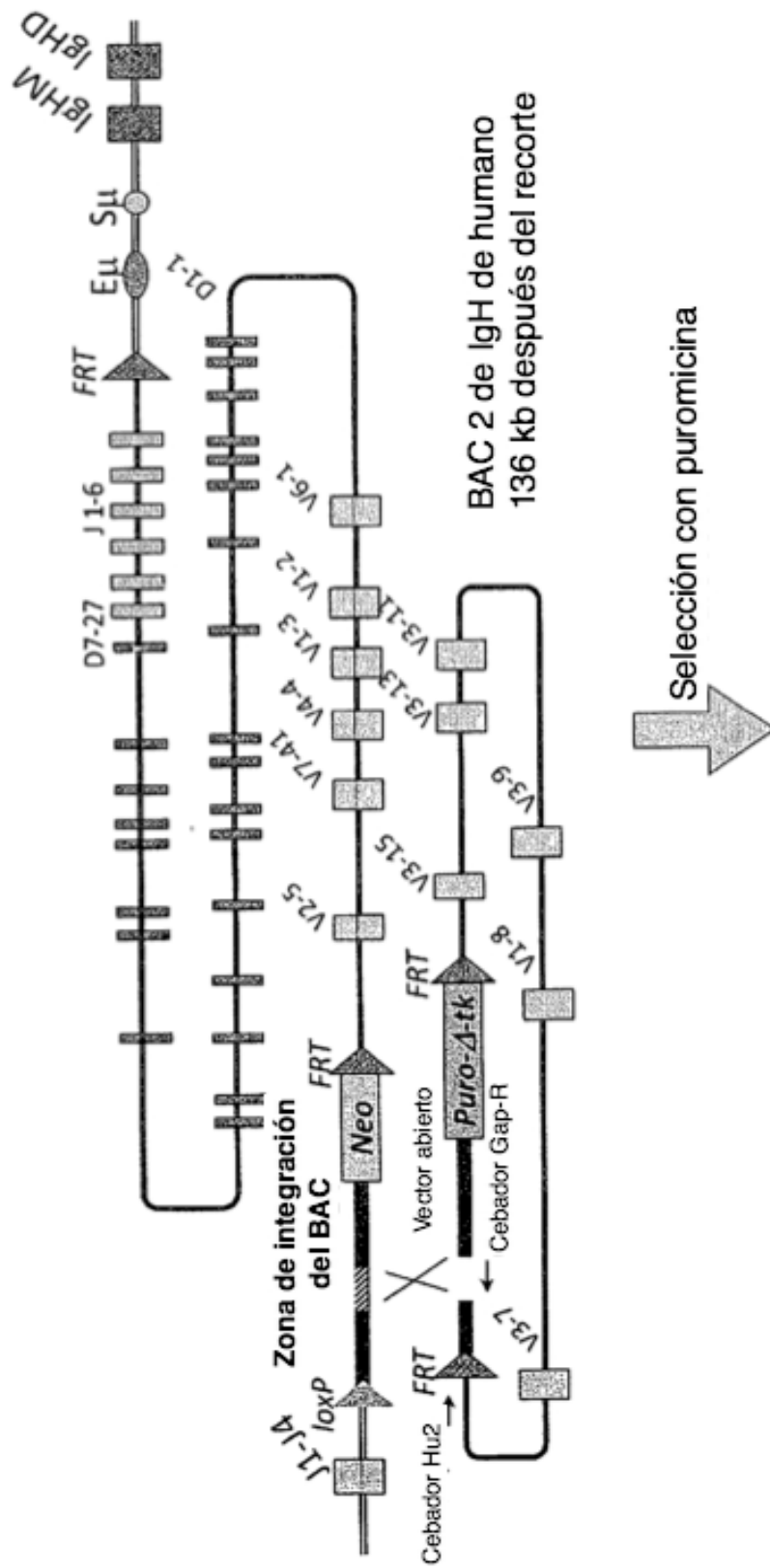


Fig. 12

Inserción del 2.º BAC: etapa 4

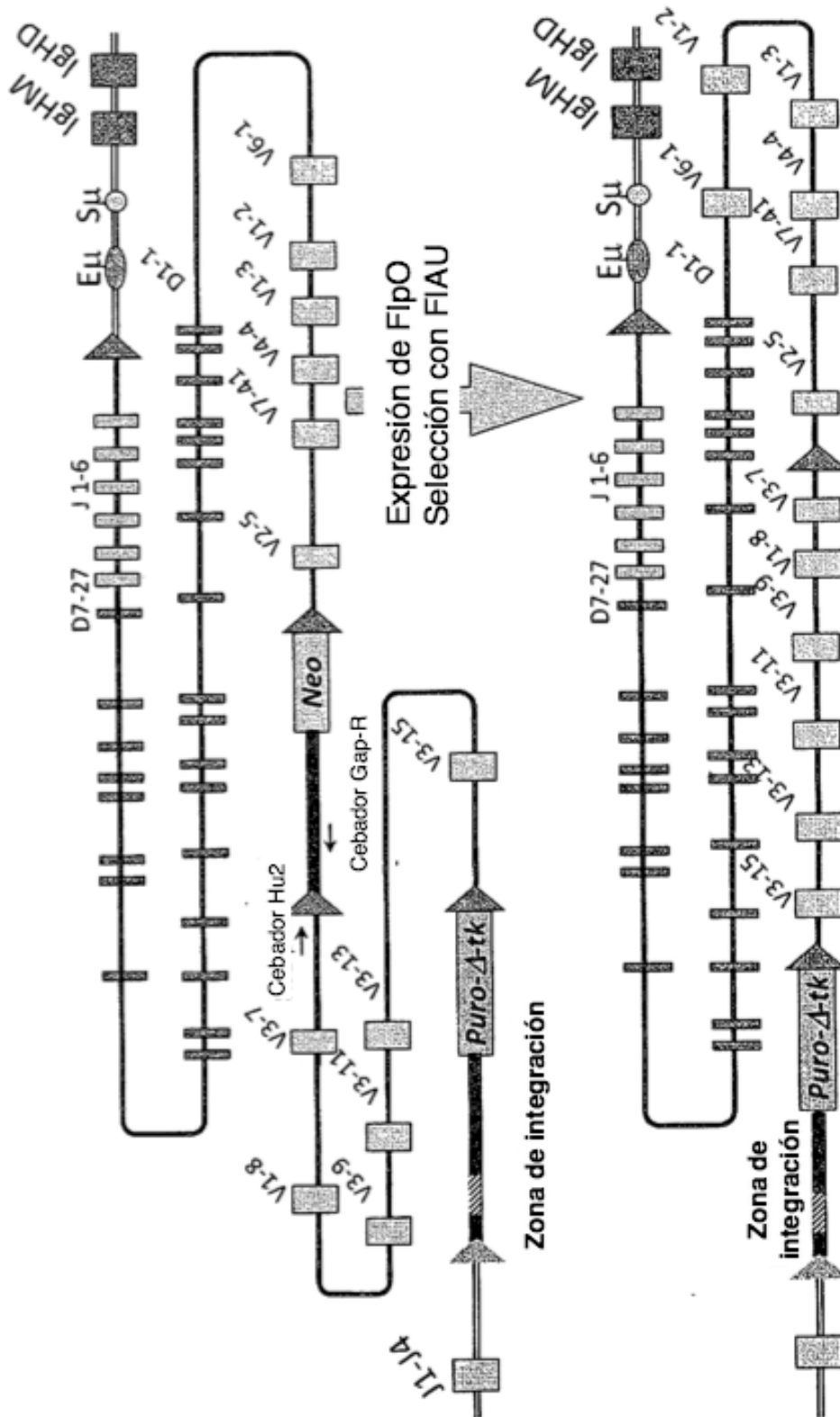


Fig. 13

Zona de integración del BAC en el locus IgK

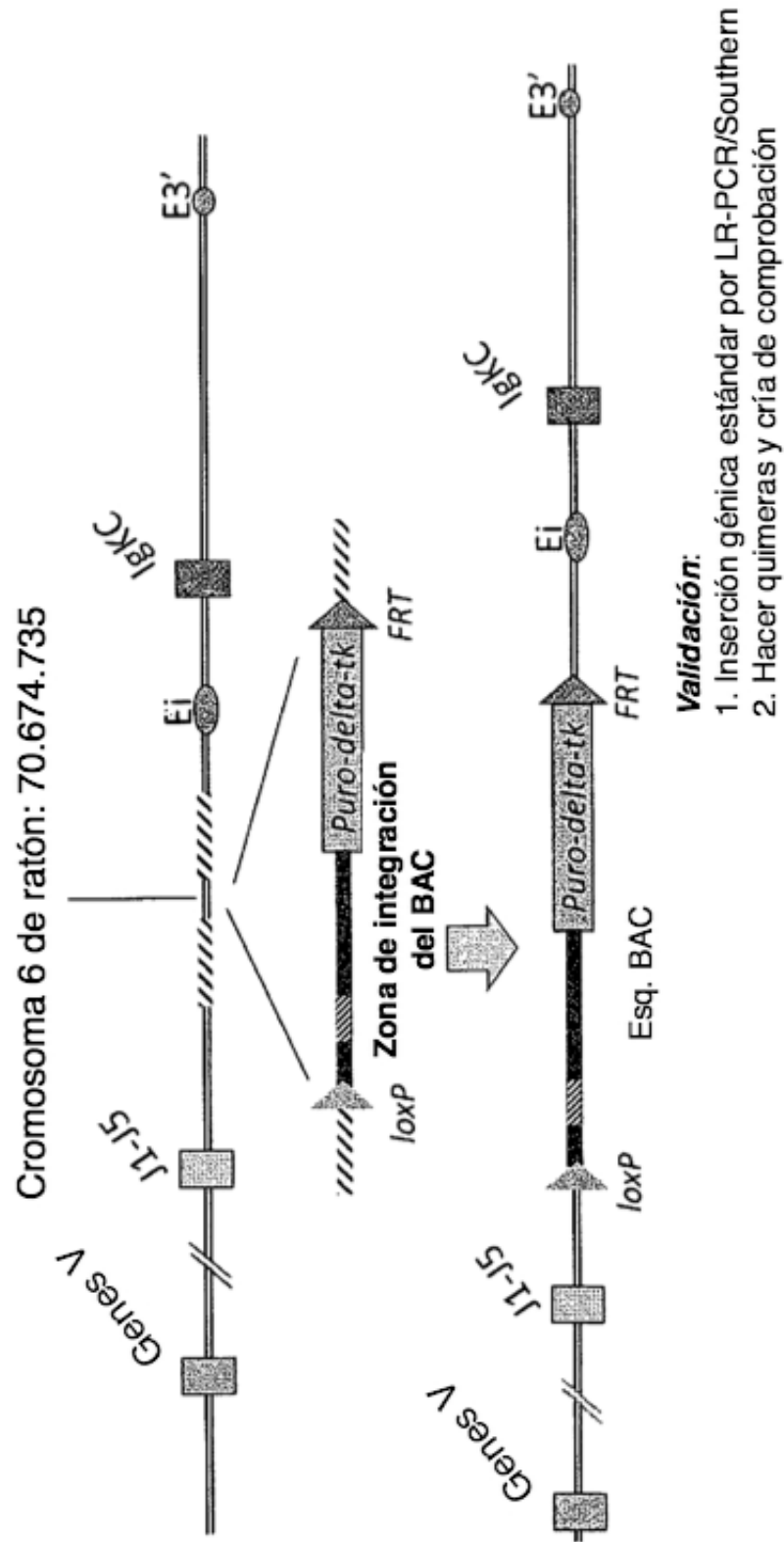


Fig. 14

Inserción del 1.º BAC: etapa 1

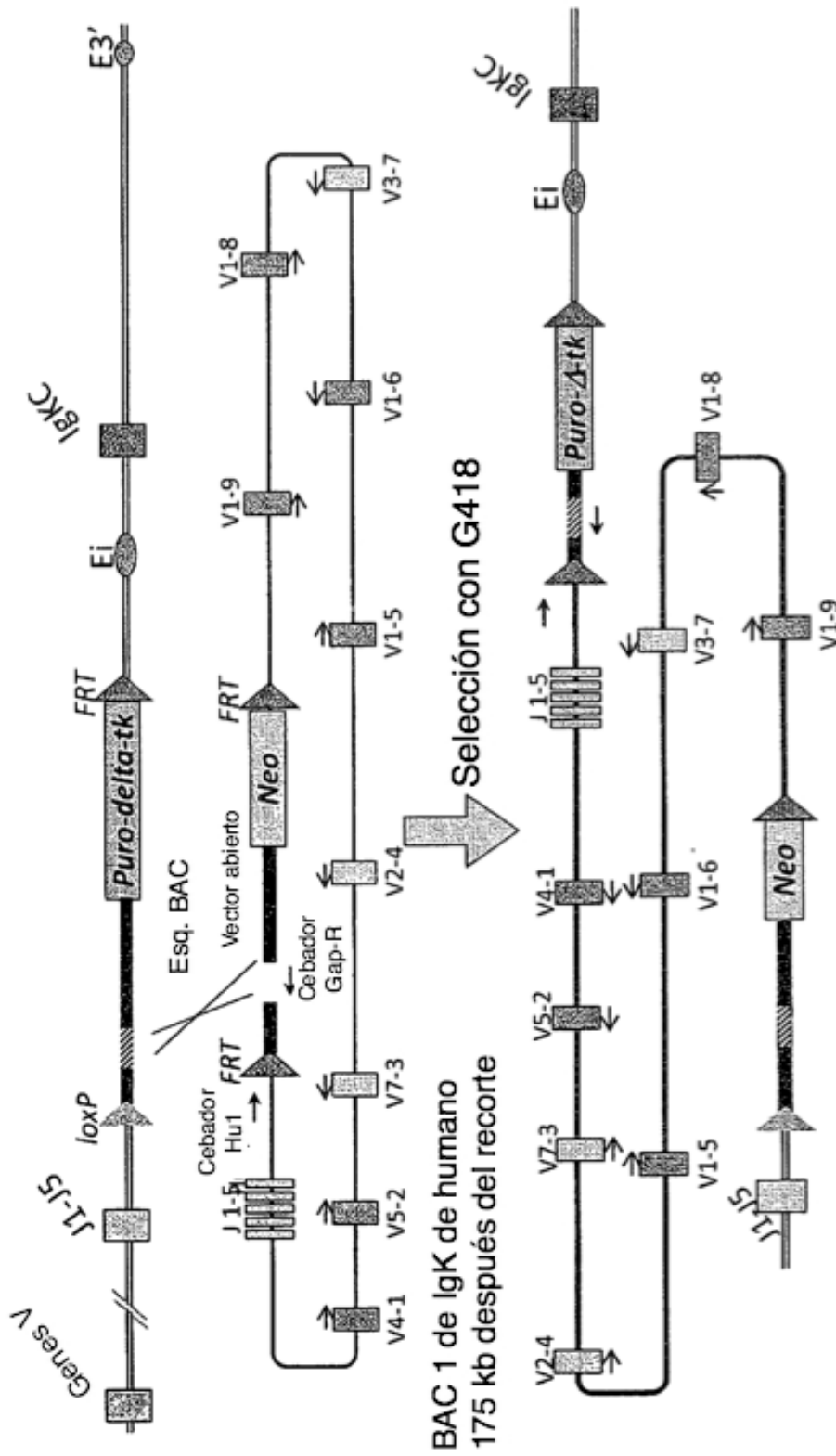


Fig. 15

Insertión del 1.º BAC: etapa 2

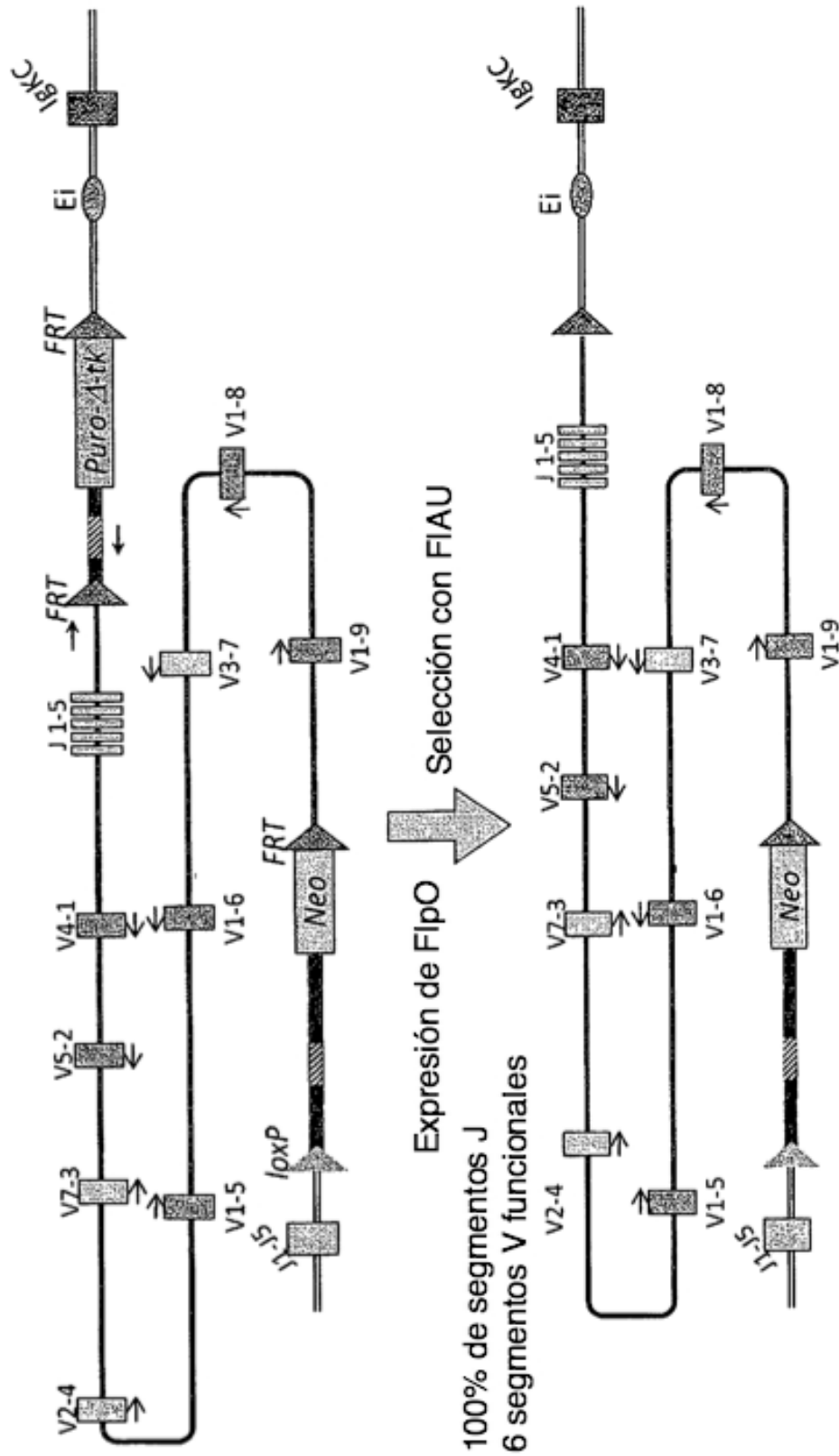


Fig. 16

Inserción del 2.º BAC: etapa 3

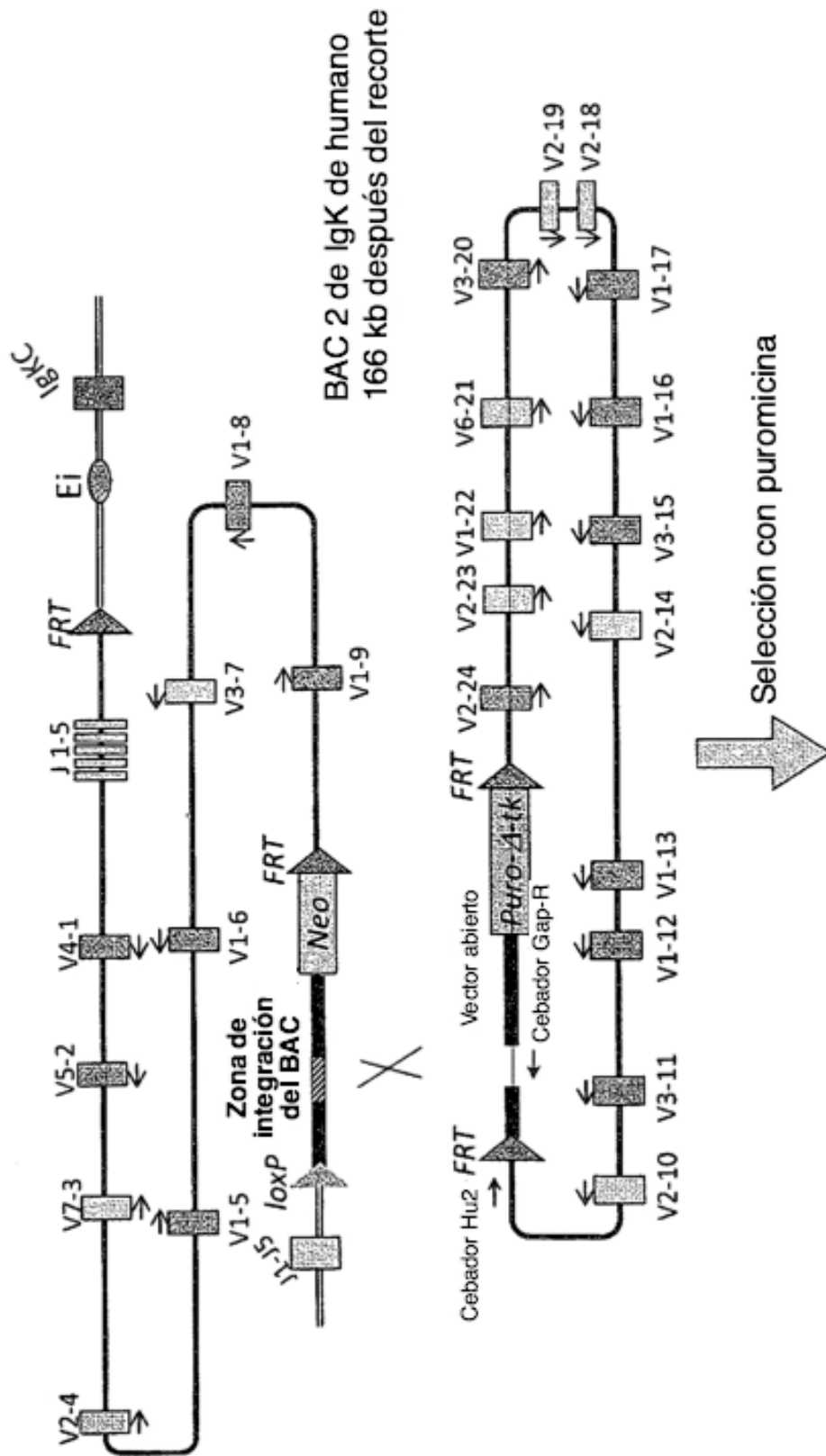
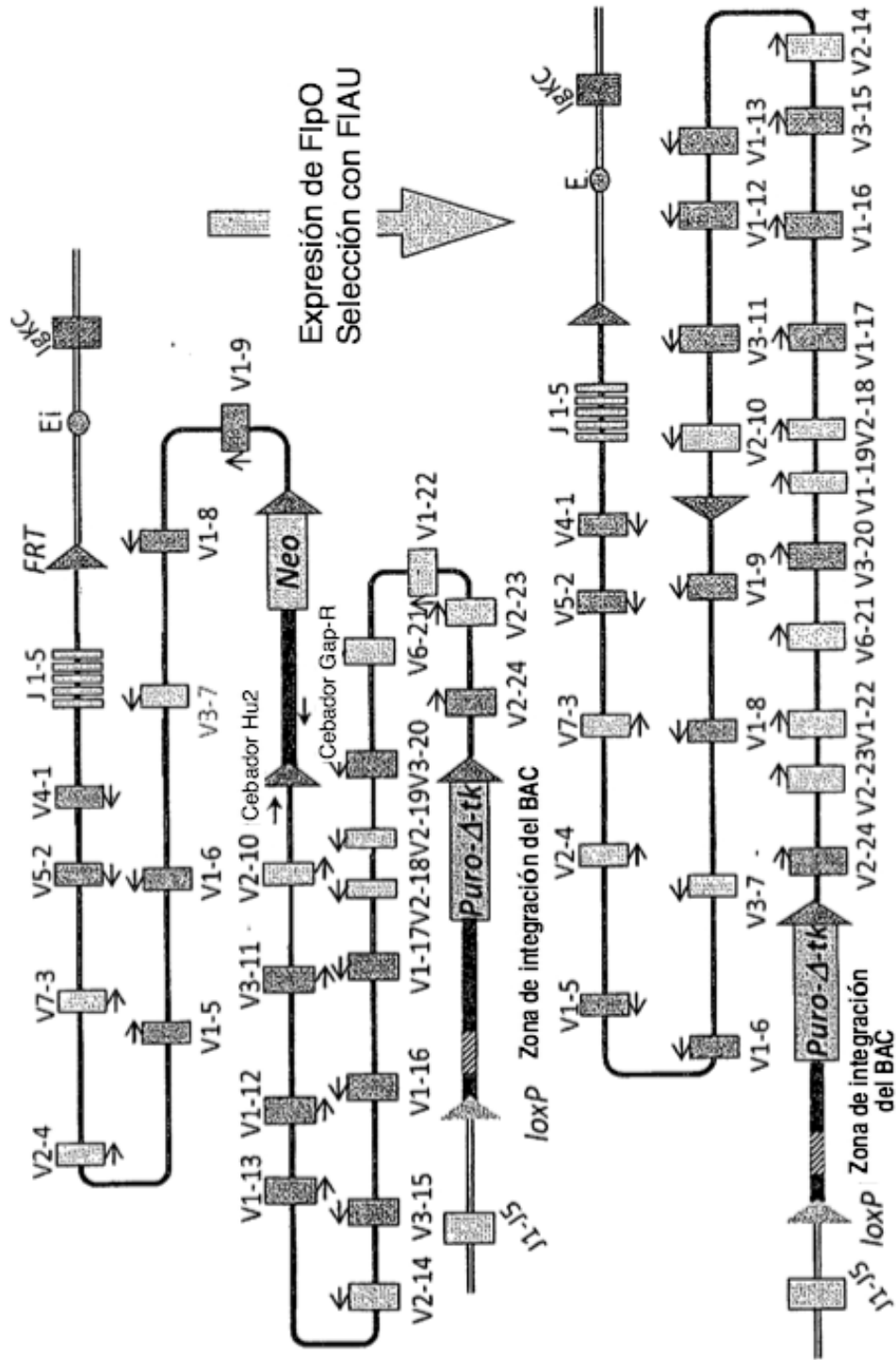


Fig. 17

Inserción del 2.º BAC: etapa 4



100% de segmentos J; 14 segmentos V funcionales

Fig. 18

Comprobación rápida de las células ES con locus IgK e IgH humanizados

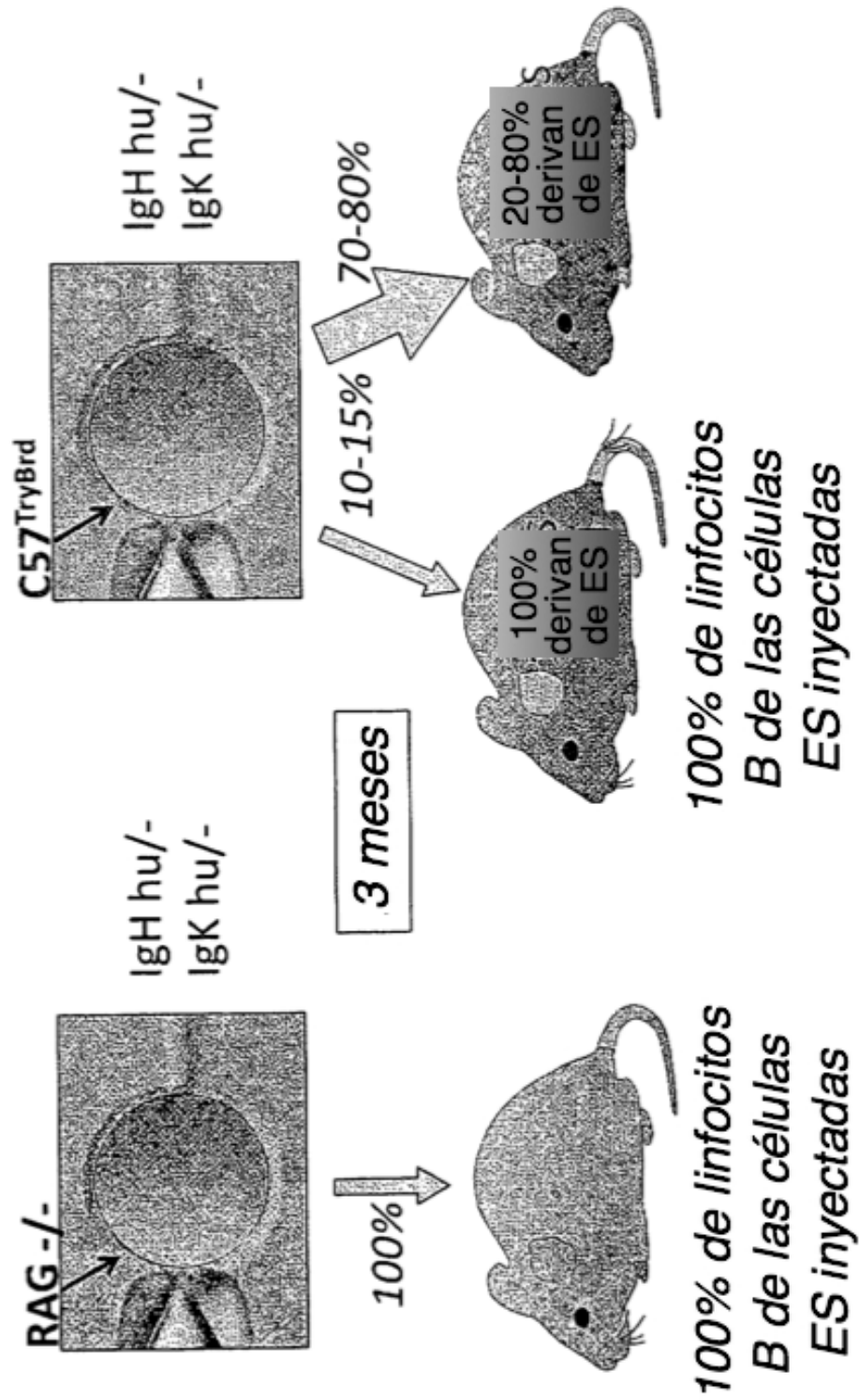


Fig. 19

Generación de anticuerpos en los ratones quiméricos con locus IgK e IgH humanizados

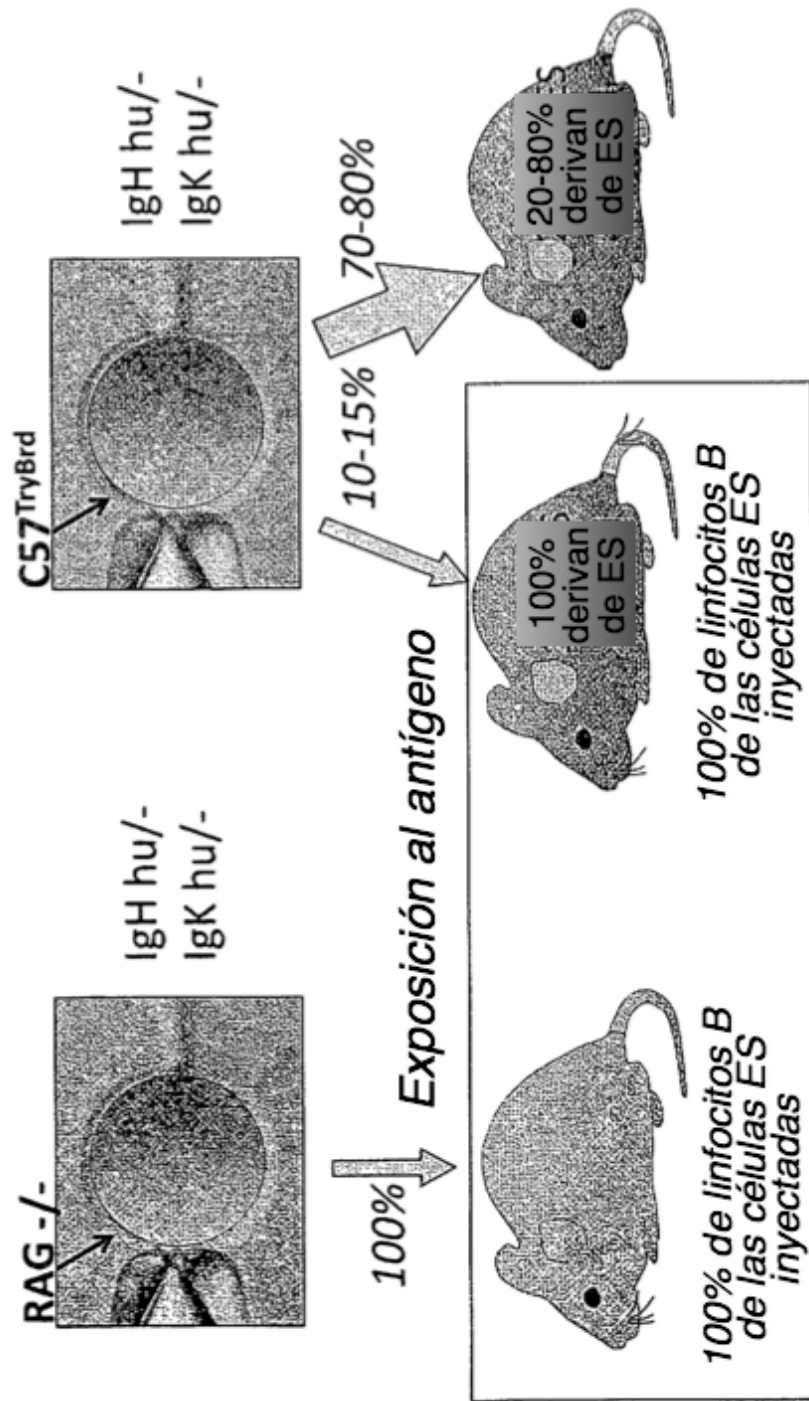


Fig. 20

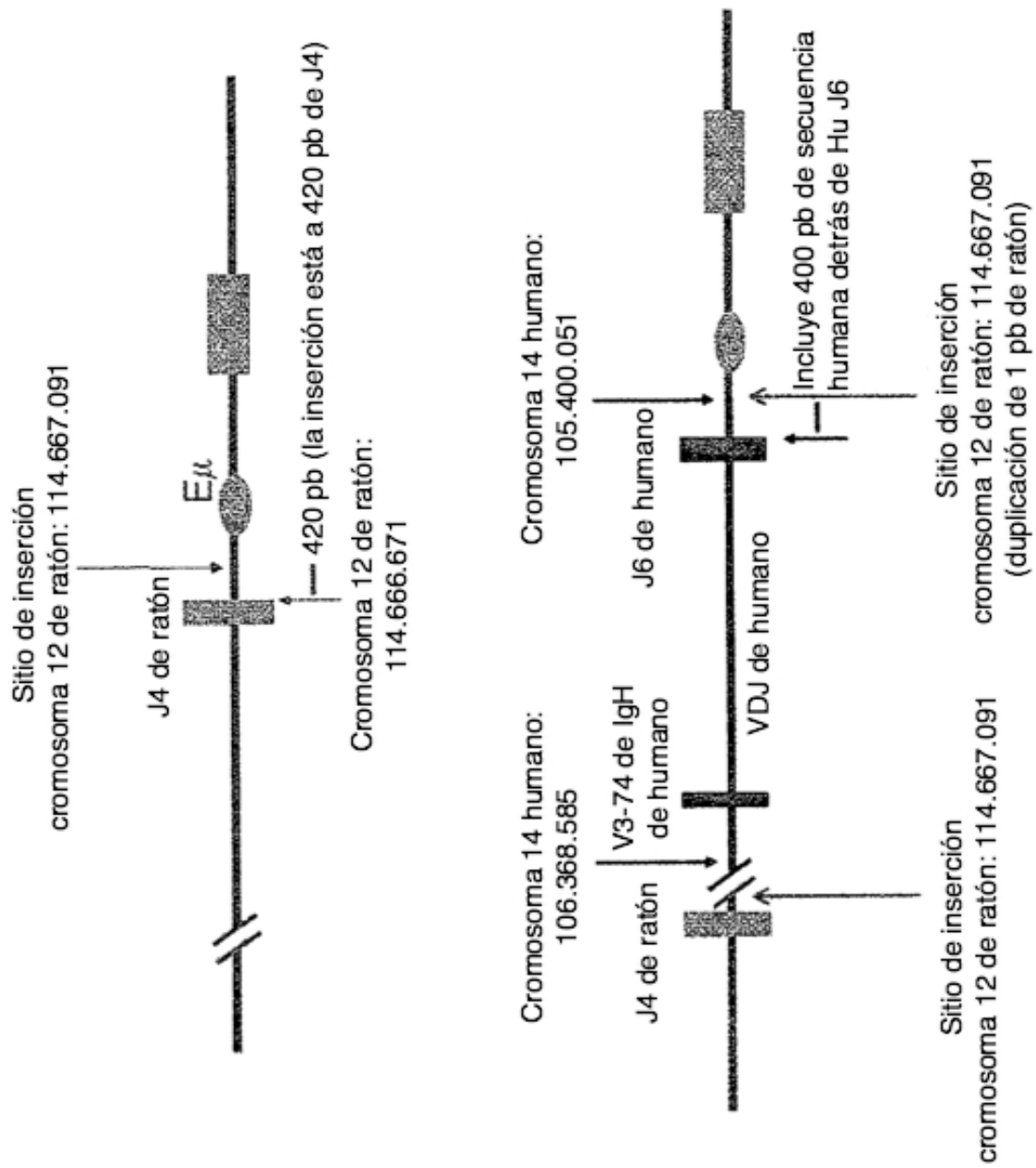


Fig. 21

Reconocimiento de la zona de integración

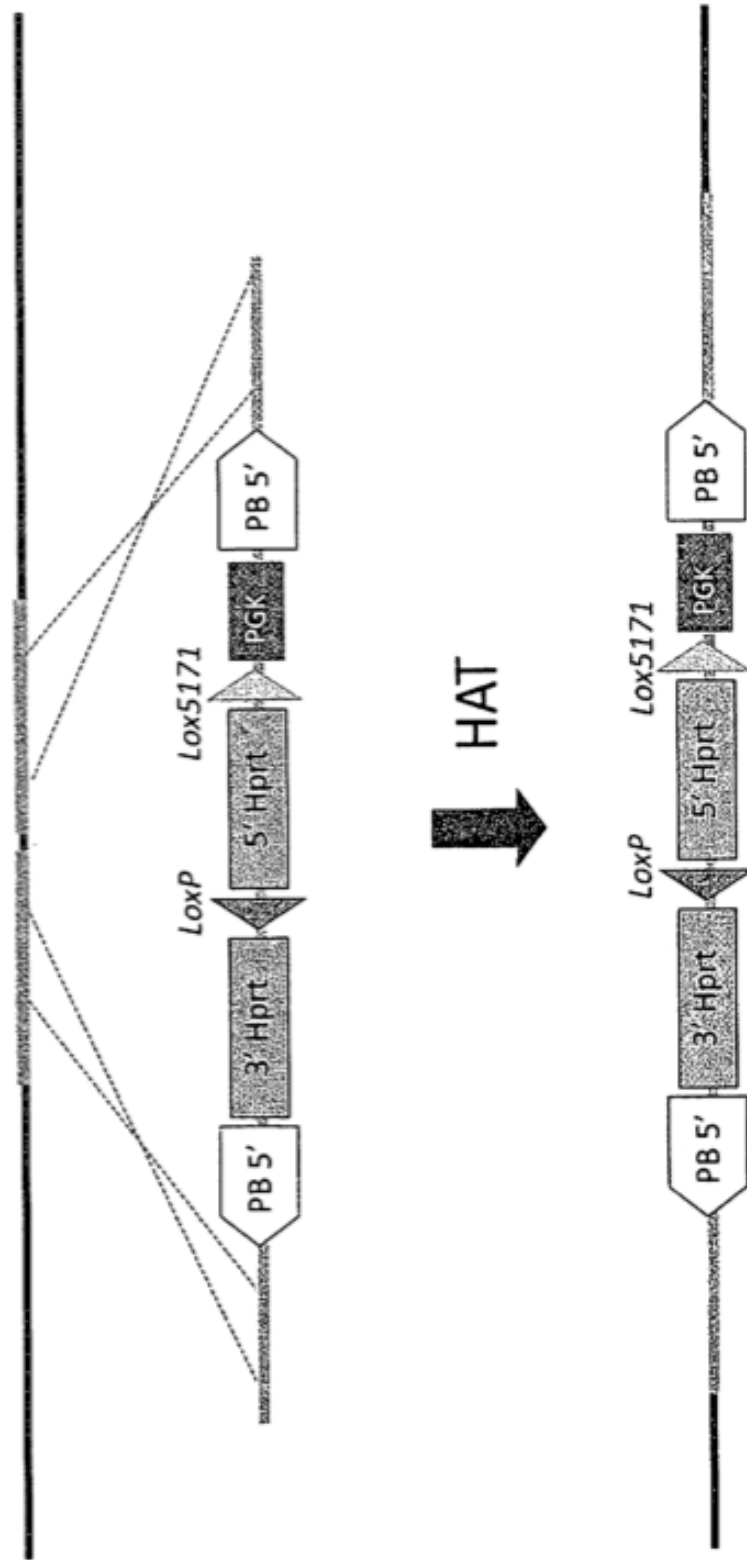


Fig. 22

Insertión del 1.º BAC

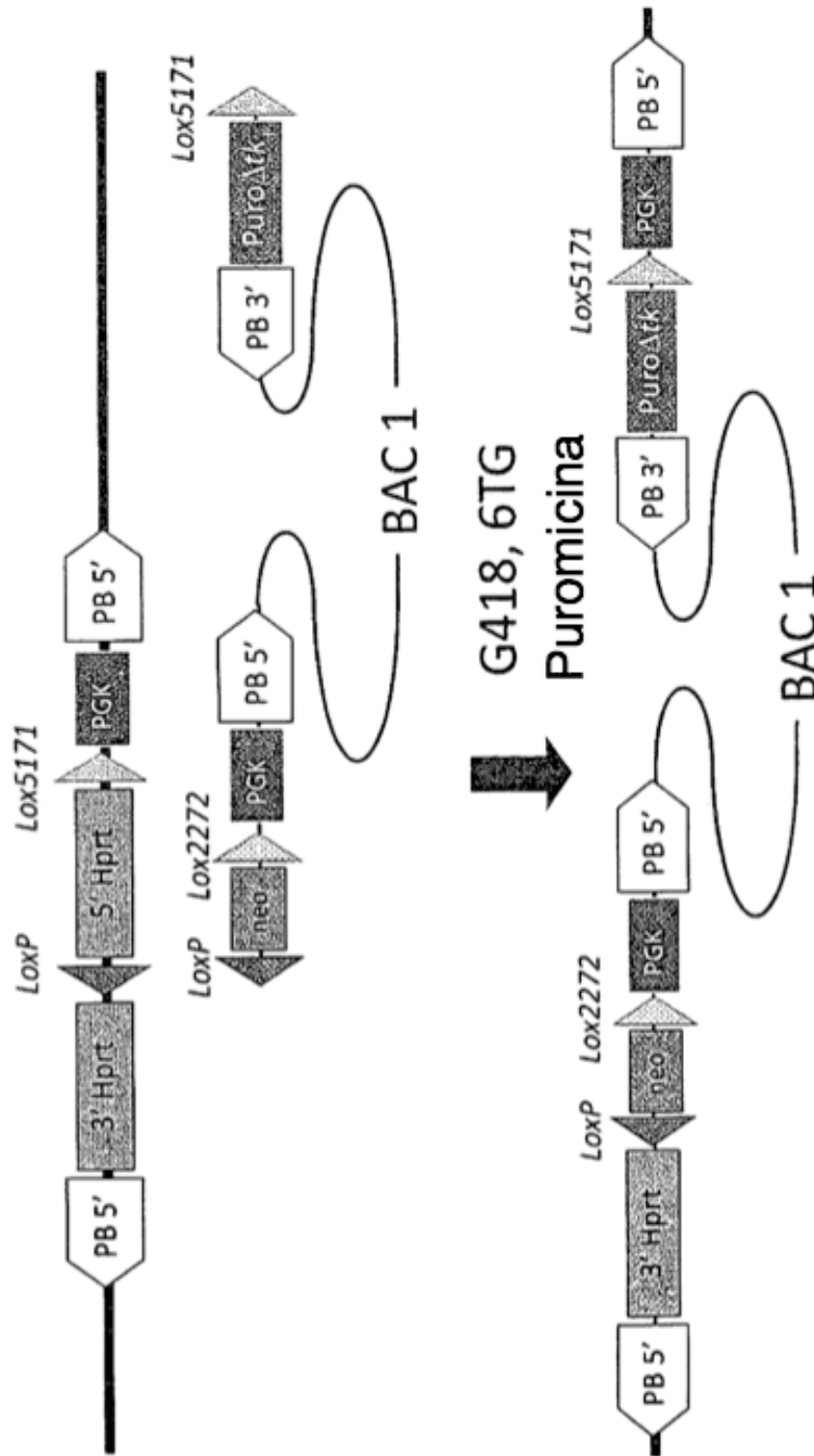


Fig. 23

Curación de la modificación en 3'

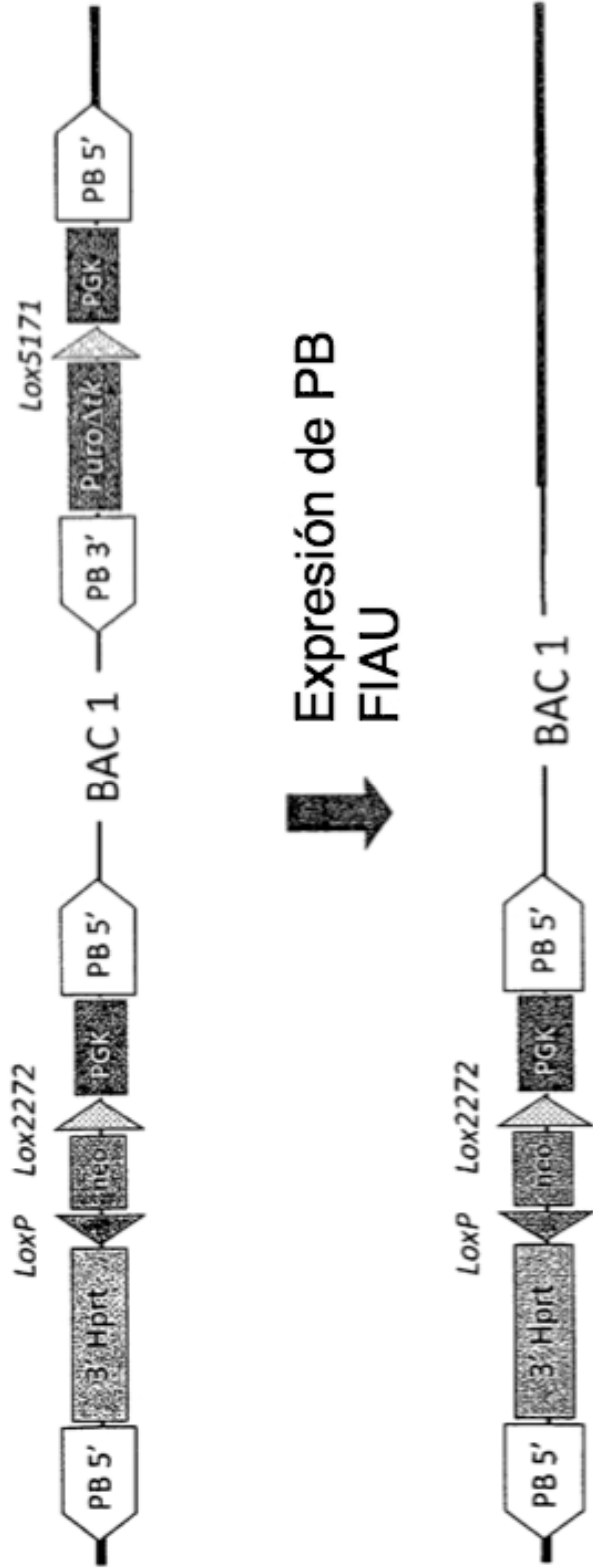


Fig. 24

Insertión del 2.º BAC

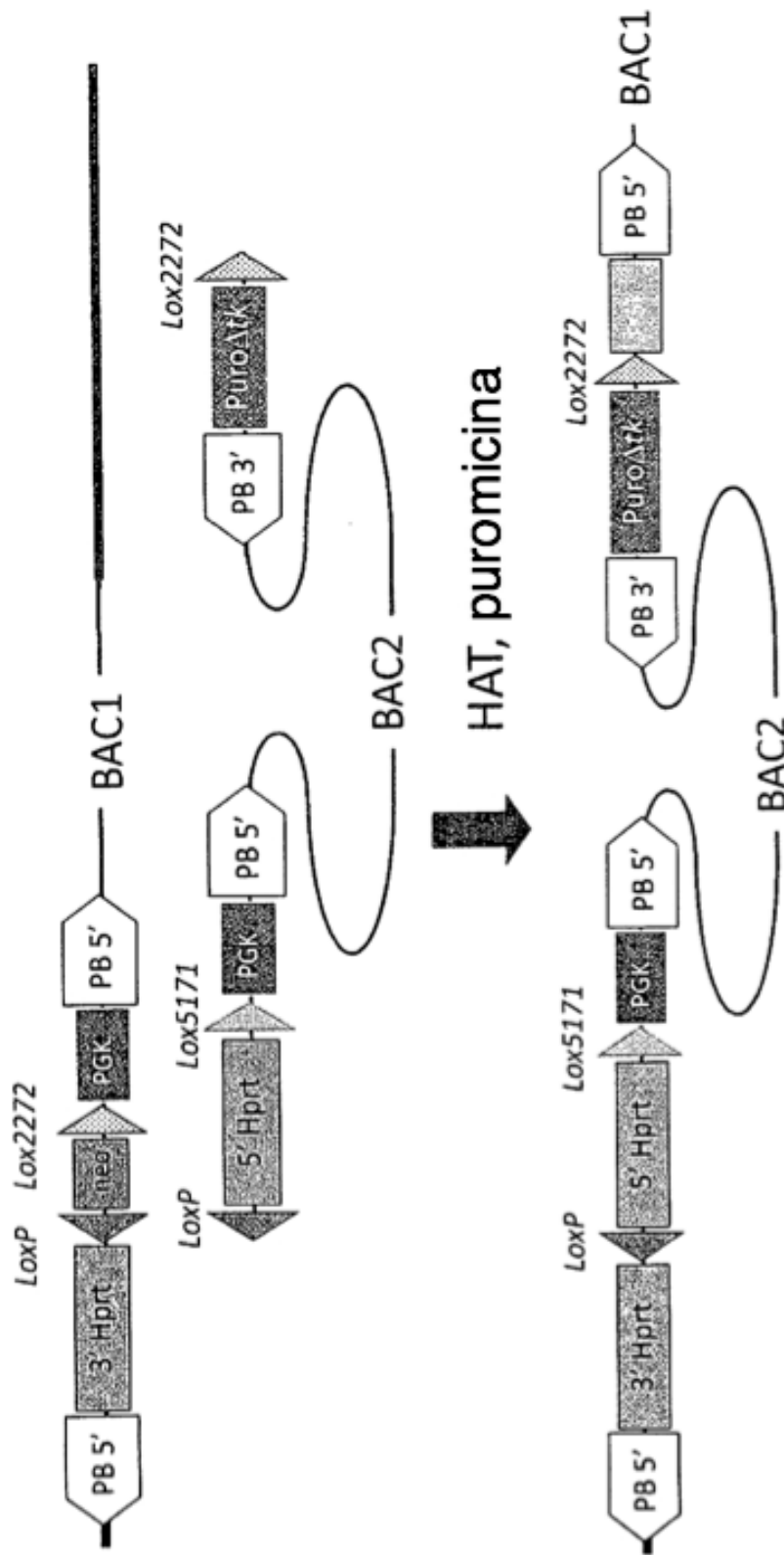


Fig. 25

Retirada de la modificación en 3'

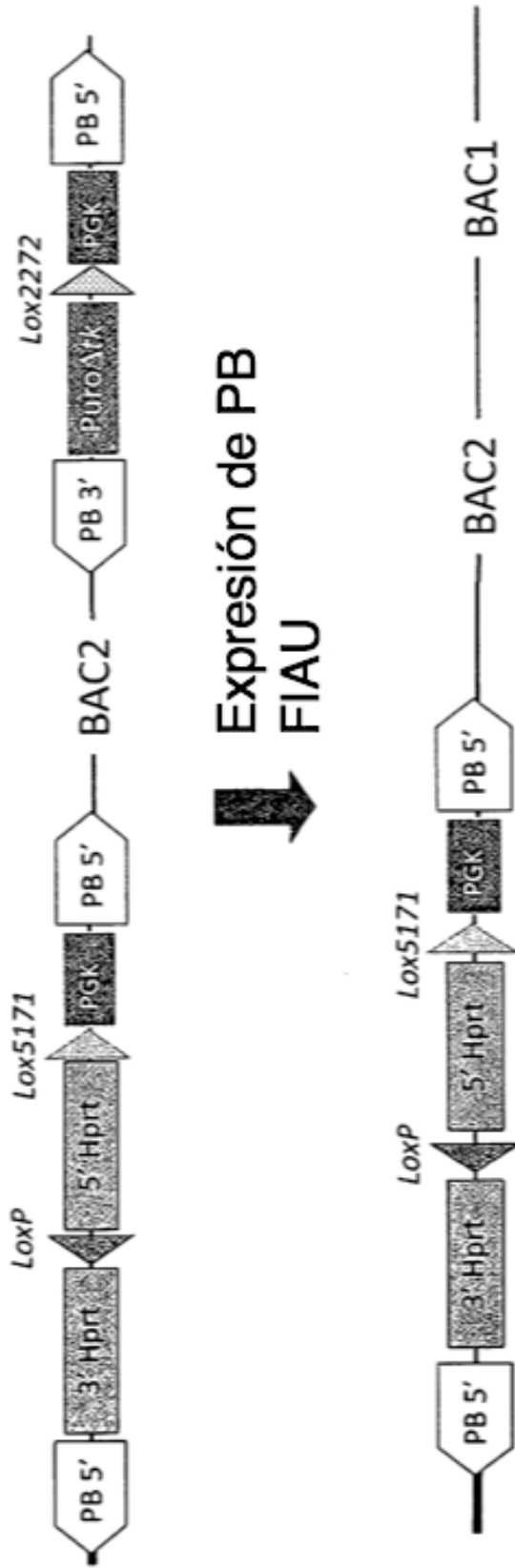


Fig. 26

Insertión del vector «volteador»

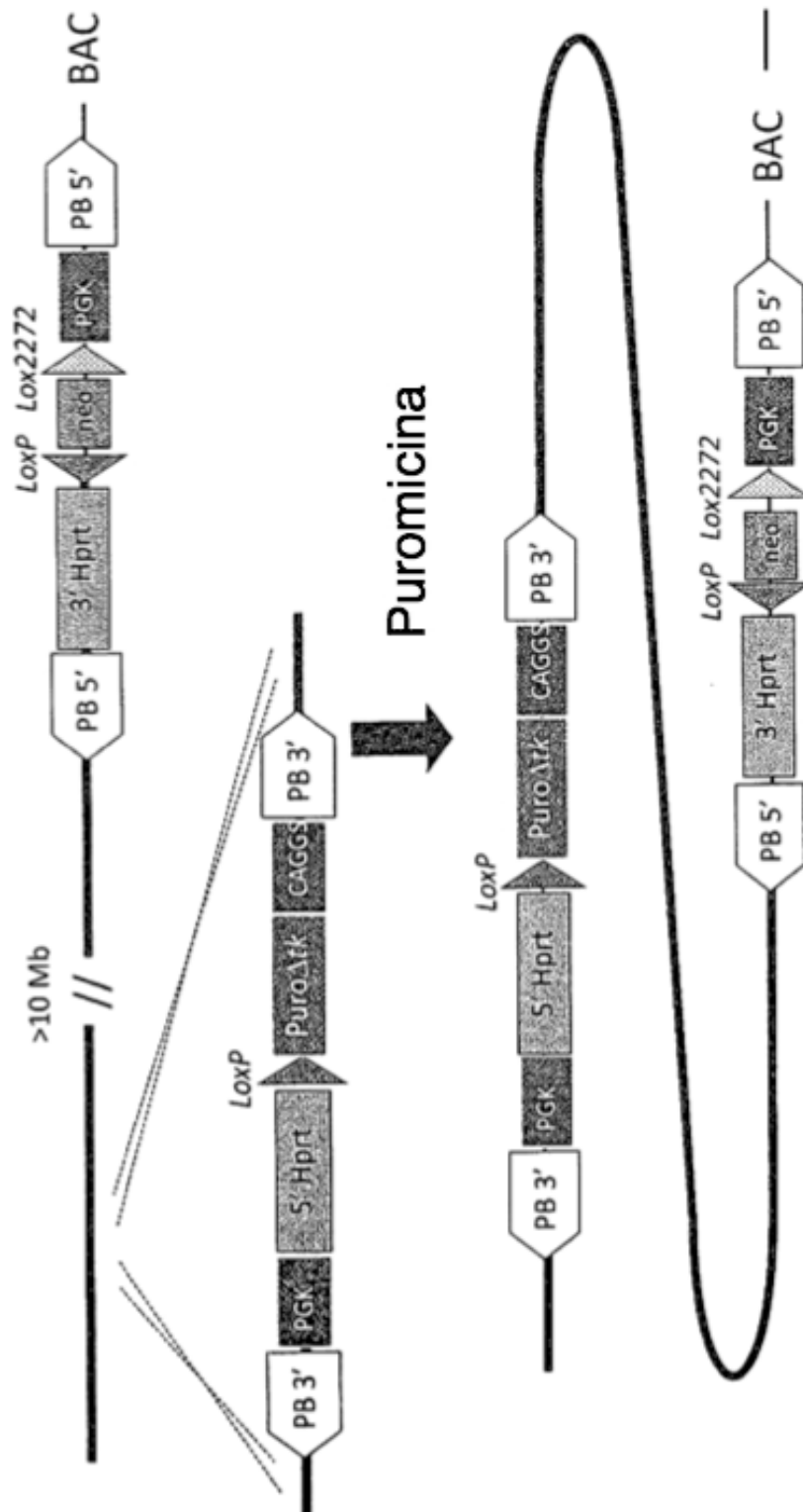


Fig. 27

Inversión

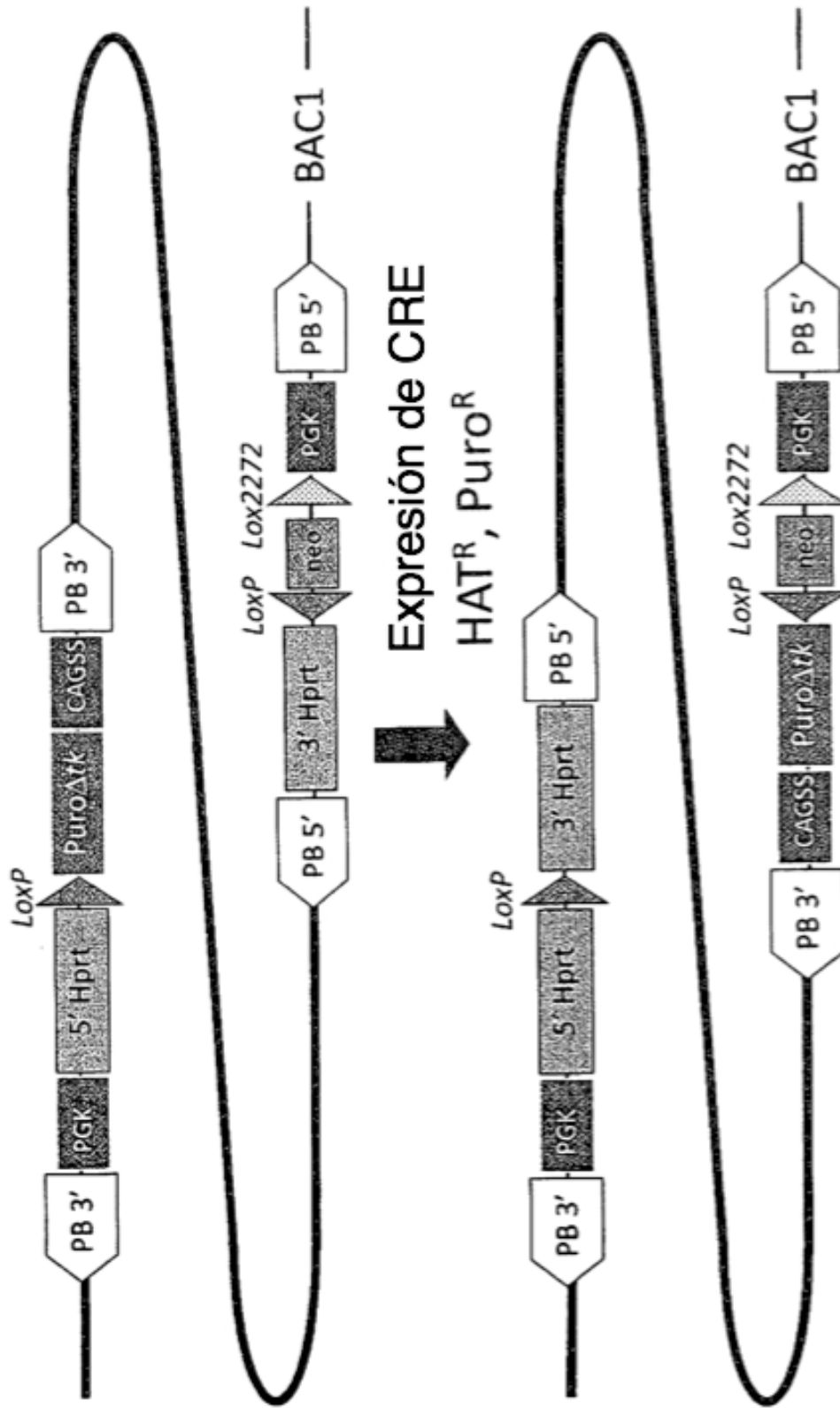
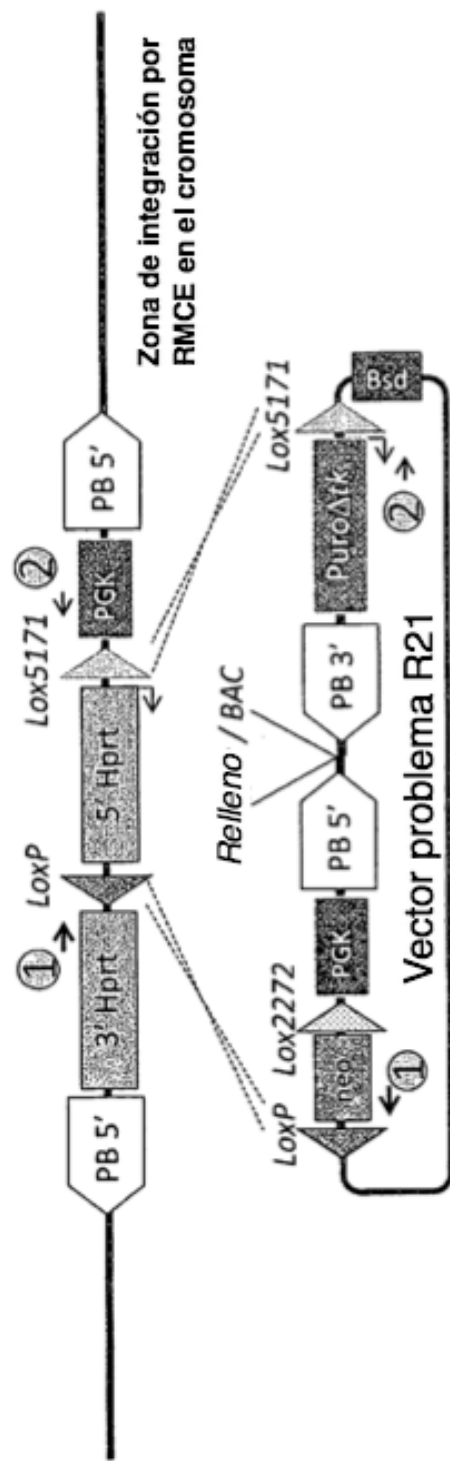


Fig. 28

RMCE secuencial: inserción en la zona de integración



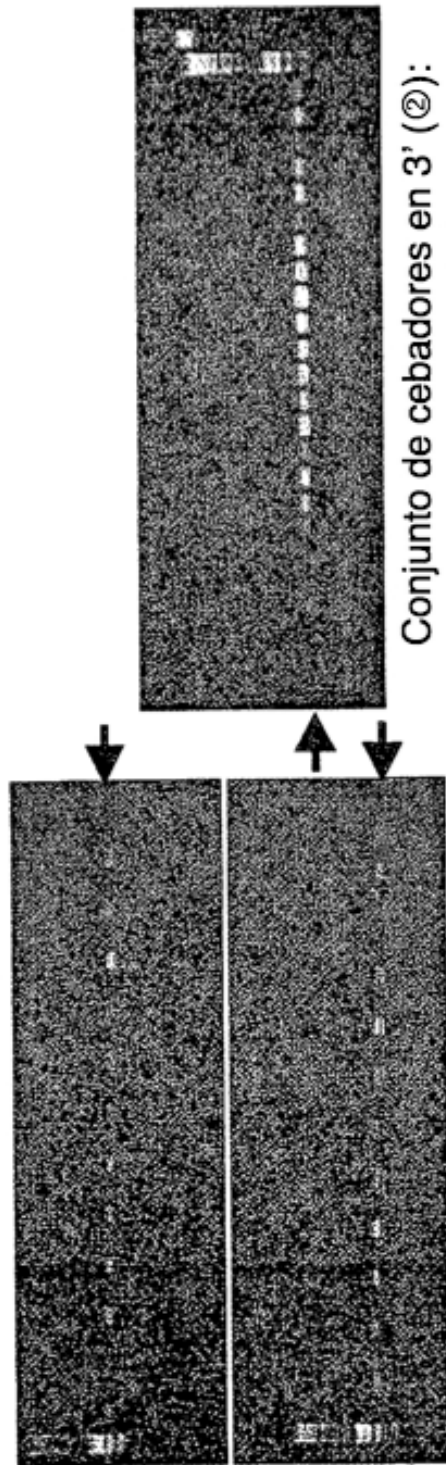
Transfectado con R21/casete de expresión de Cre

Selección:	Puromicina	Puromicina + 6TG	G418	G418 + 6TG
N.º de colonias:	239	220	360	198

Fig. 30

Confirmación de la inserción correcta en la zona de integración

Colonias: resistentes a 6-TG y puromicina



Conjunto de cebadores en 3' (Ⓢ):
son correctos 20 de los 24

Conjunto de cebadores en 5' (Ⓢ):
son correctos 23 de los 24

Resumen:

	Puro + 6TG	Puro	G418 + 6TG	G418
N.º de colonias	220	239	198	360
PCR en la unión	5'	5'	5'	5'
	23/24	22/24	22/24	11/24
	3'	3'	3'	3'
	20/24	19/24	22/24	11/24

Fig. 31

Confirmación por PCR de la curación del extremo 3'

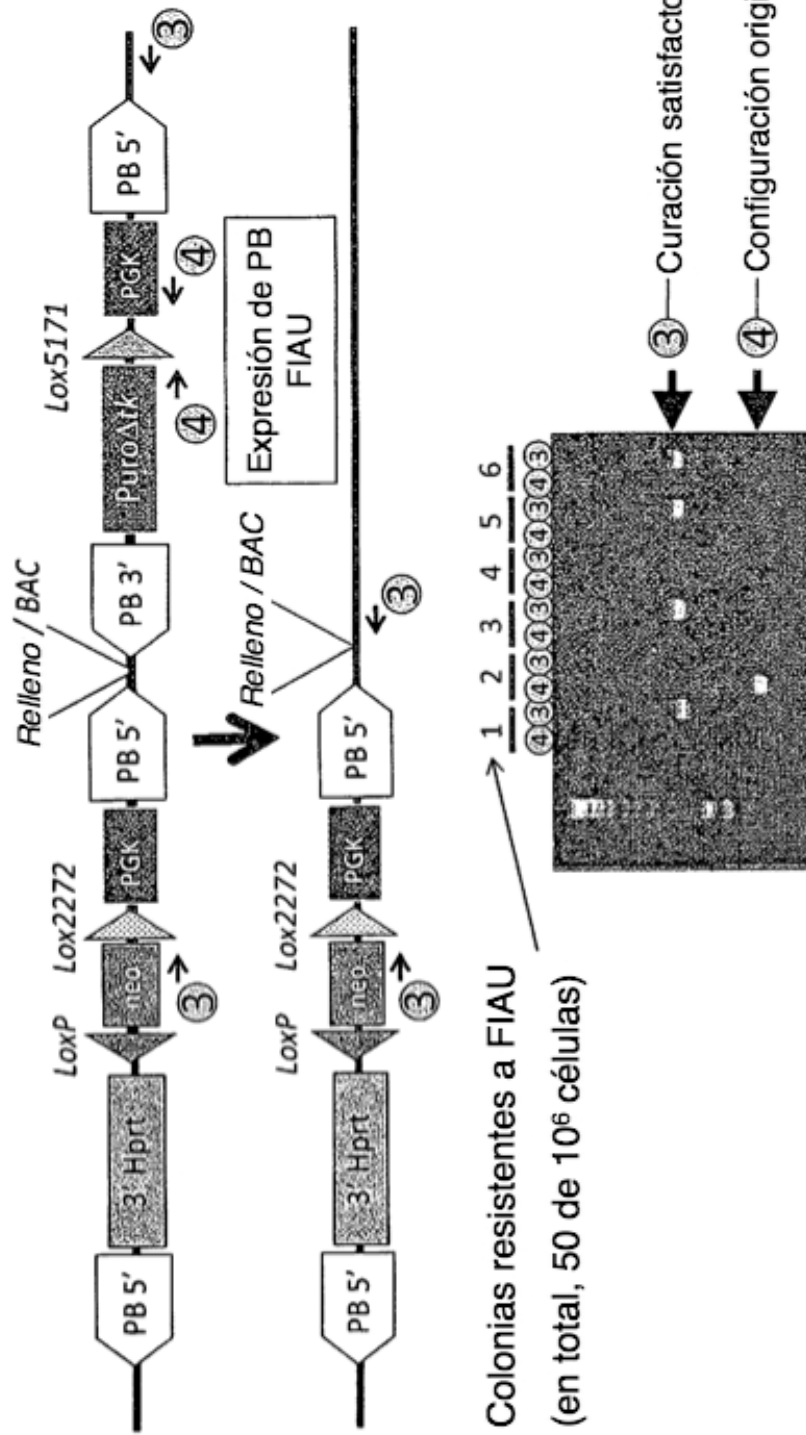


Fig. 32

Insertión del BAC 1: diagnóstico por PCR

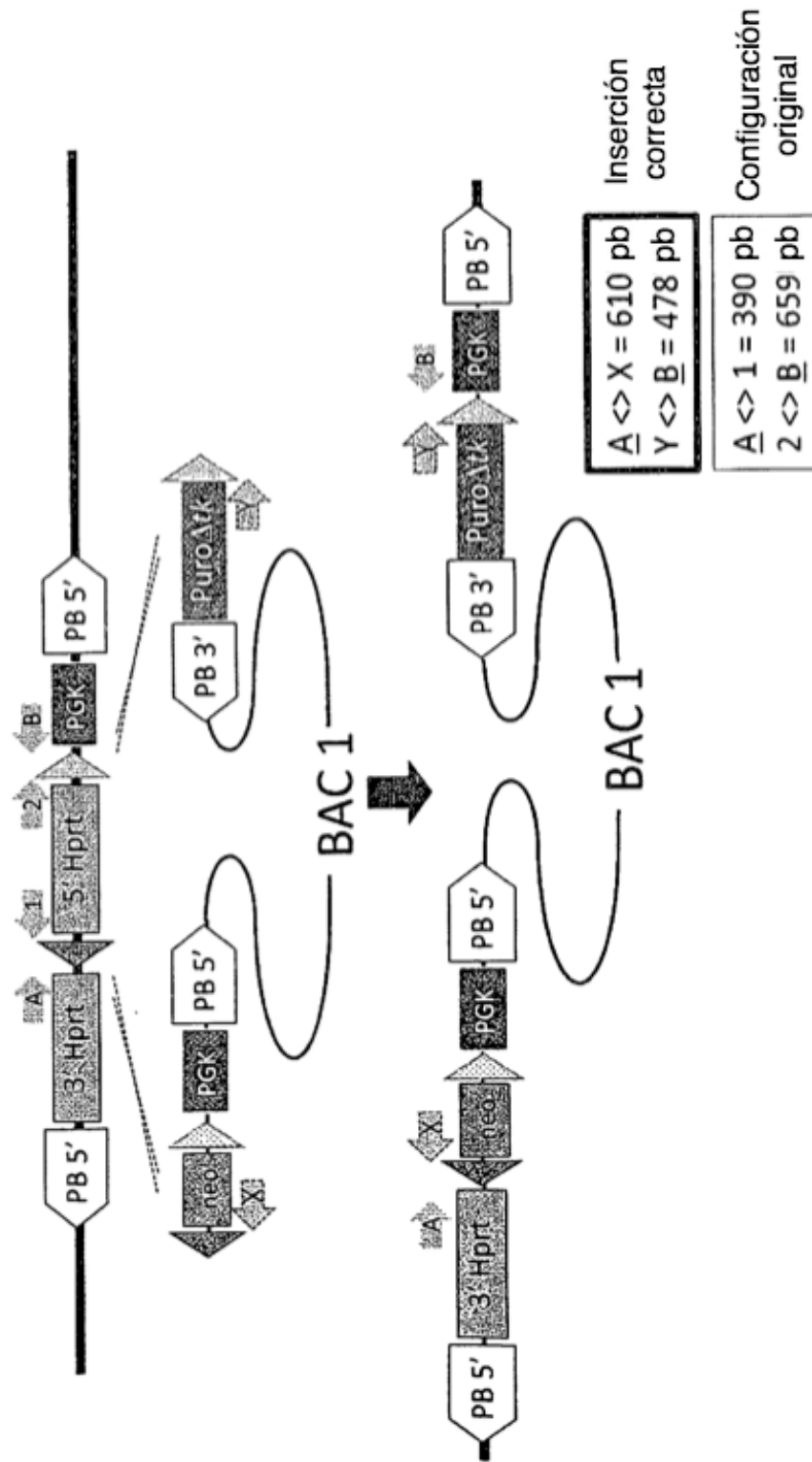
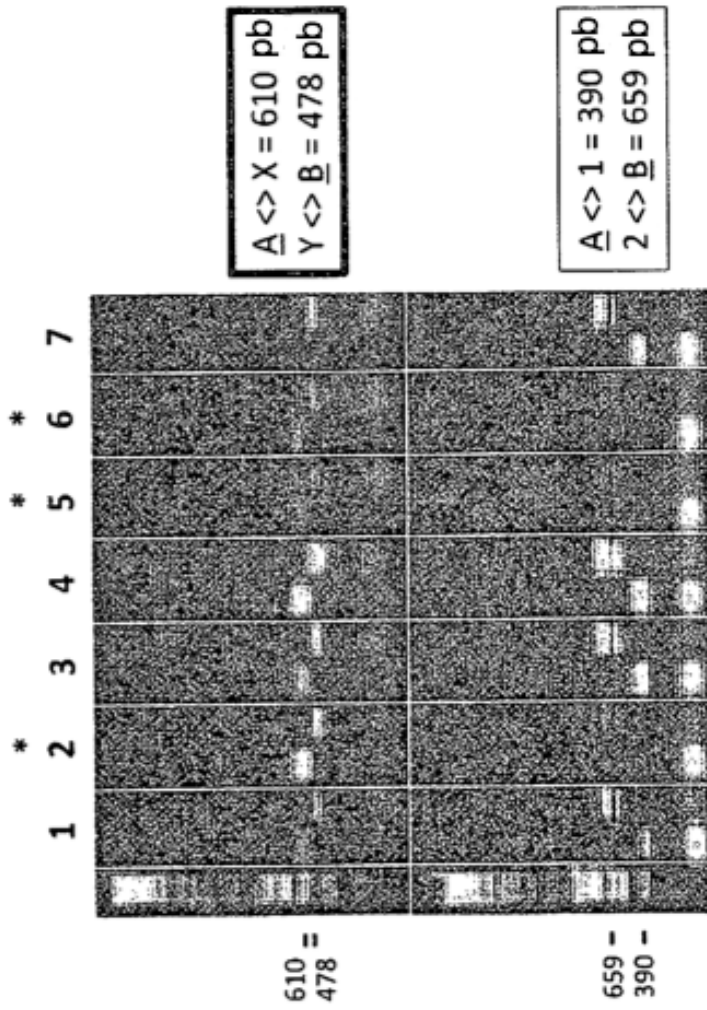


Fig. 33

Inserción del BAC 1: diagnóstico por PCR



Los clones 2, 5, y 6 tienen insertado el BAC 1

Los clones 1, 3, 4 y 7 probablemente tienen insertado el BAC 1, pero las muestras están mezcladas con las líneas celulares originales

Fig. 34