

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 241**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2012 PCT/US2012/062029**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2013 WO13063340**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2012 E 12806199 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2770822**

54 Título: **Ratones modificados genéticamente que expresan moléculas quiméricas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) de clase II**

30 Prioridad:

28.10.2011 US 201161552584 P

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

02.11.2017

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**MACDONALD, LYNN;
MURPHY, ANDREW J.;
TU, NAXIN;
GURER, CAGAN;
VORONINA, VERA y
STEVENS, SEAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 640 241 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

Ratones modificados genéticamente que expresan moléculas quiméricas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) de clase II

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un roedor (por ejemplo, un ratón o una rata) que se ha modificado genéticamente para expresar una proteína del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) de clase de II humanizada. La invención se refiere además a métodos de obtención de un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína del MHC II humanizada. Se describen también en la presente memoria métodos para utilizar roedores, células, y tejidos que expresan una proteína del MHC de clase II humanizada para identificar péptidos que activan linfocitos y se acoplan a linfocitos T, y para el desarrollo de vacunas humanas y otros productos terapéuticos.

15

Antecedentes de la invención

En la respuesta inmunitaria adaptativa, las moléculas receptoras reconocen los antígenos extraños sobre los linfocitos B (por ejemplo, inmunoglobulinas) y los linfocitos T (por ejemplo, receptor de linfocitos T o TCR). Estos antígenos extraños se presentan sobre la superficie de las células como fragmentos peptídicos mediante proteínas especializadas, denominadas genéricamente como moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC). Las moléculas del MHC están codificadas por múltiples loci que se encuentran como agrupaciones unidas de genes con una longitud de aproximadamente 4 Mb. En ratones, los genes del MHC se encuentran en el cromosoma 17 y, por motivos históricos, reciben el nombre de genes de histocompatibilidad 2 (H-2). En seres humanos, los genes se encuentran en el cromosoma 6 y se denominan genes de los antígenos leucocitarios humanos (HLA). Los loci en ratones y seres humanos son poligénicos; incluyen tres clases de genes MHC muy polimórficas (clase I, II y III) que presentan una organización similar en los genomas humano y murino (ver la Fig. 2 y la Fig. 3, respectivamente).

20

25

Los loci del MHC presentan el mayor polimorfismo del genoma; algunos genes están representados por >300 alelos (por ejemplo, HLA-DR β humano y HLA-B humano). Todos los genes del MHC de clase I y II pueden presentar fragmentos peptídicos, pero cada gen expresa una proteína con diferentes características de unión, reflejando polimorfismos y variantes alélicas. Cualquier individuo dado tiene una gama única de fragmentos peptídicos que pueden presentarse sobre la superficie celular a los linfocitos B y T en el curso de una respuesta inmunitaria.

30

Tanto los seres humanos como los ratones tienen genes del MHC de clase II (ver las Figs. 2 y 3). En los seres humanos los genes del MHC II clásicos se denominan HLA-DP, HLA-DQ, y HLA-DR, mientras que en los ratones son H-2A y H-2E (abreviados a menudo como I-A y I-E, respectivamente). Las proteínas adicionales codificadas por los genes del locus del MHC II, HLA-DM y HLA-DO en humanos, y H-2M y H-2O en ratones no se encuentran sobre la superficie celular, sino que se hallan en el compartimento endocítico y aseguran la carga adecuada de las moléculas del MHC II con péptidos. Las moléculas de clase II consisten en dos cadenas de polipéptidos: cadena α y cadena β . La porción extracelular de la cadena α contiene dos dominios extracelulares, $\alpha 1$ y $\alpha 2$; y la porción extracelular de la cadena β contiene también dos dominios extracelulares, $\beta 1$ y $\beta 2$ (ver la Fig. 1). Las cadenas α y β están asociadas no covalentemente entre sí.

35

40

Las moléculas del MHC de clase II se expresan en células presentadoras de antígenos (APC), por ejemplo, linfocitos B, macrófagos, células dendríticas, células endoteliales durante el curso de la inflamación, etc. Las moléculas del MHC II expresadas sobre la superficie de las APC presentan normalmente los antígenos generados en las vesículas intracelulares a los linfocitos T CD4+. Para participar en el acoplamiento de los linfocitos T CD4+, el complejo entre el MHC de clase II y el antígeno de interés debe ser lo suficientemente estable para sobrevivir un lapso de tiempo suficientemente largo para acoplarse con los linfocitos T CD4+. Cuando un linfocito T CD4+ auxiliar se acopla a un complejo de péptido extraño/MHC II sobre la superficie de una APC, el linfocito T se activa para liberar citoquinas que ayudan en la respuesta inmunitaria contra el invasor.

50

No todos los antígenos provocarán la activación de los linfocitos T debido a mecanismos de tolerancia. Sin embargo, en algunas enfermedades (por ejemplo, el cáncer, enfermedades autoinmunitarias), los péptidos derivados de autoproteínas se convierten en la diana del componente celular del sistema inmunitario, lo que da lugar a la destrucción de las células que presentan dichos péptidos. Se ha producido un avance significativo en el reconocimiento de los antígenos que son clínicamente significativos (por ejemplo, antígenos asociados con diversos tipos de cáncer). Sin embargo, para mejorar la identificación y la selección de los péptidos que provocarán una respuesta adecuada en un linfocito T humano, en particular los péptidos de antígenos clínicamente significativos, siguen siendo necesarios sistemas *in vivo* e *in vitro* que imiten aspectos del sistema inmunitario humano. De este modo, existe una necesidad de sistemas biológicos (por ejemplo, células y animales no humanos genéticamente modificados) que puedan expresar componentes de un sistema inmunitario humano.

55

60

65

Sumario de la invención

Se proporciona un sistema biológico para generar o identificar péptidos que se asocian con las proteínas del MHC de clase II humanas, y quimeras de las mismas, y que se unen a los linfocitos T CD4+. Se proporcionan roedores que comprenden células no humanas que expresan moléculas humanizadas que funcionan en las respuestas inmunitarias celulares. Se describen también loci de roedores humanizados que codifican proteínas del MHC II humanizadas. Se describen también células de roedores humanizados que expresan moléculas del MHC humanizadas. Se describen sistemas *in vivo* e *in vitro* que comprenden células de roedores humanizados, en donde las células de roedores expresan una o más moléculas del sistema inmunitario humanizadas.

Se proporciona en la presente memoria un roedor (por ejemplo, un ratón o una rata) que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un complejo MHC II humanizado, en donde una porción humana del complejo MHC II humanizado comprende un dominio extracelular de un complejo MHC II humano, por ejemplo, los dominios alfa 1 y alfa 2 del MHC II humanizados y los dominios beta 1 y beta 2 del MHC II β humanizados como se indica en la reivindicación 1.

En un aspecto, se proporciona en la presente memoria un animal roedor que comprende, en un locus endógeno del gen α del MHC II, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor en donde una porción humana de dicho polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor comprende un dominio α extracelular del MHC II humano, en donde el dominio α extracelular del MHC II humano en el animal comprende los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del MHC II humano. El roedor expresa un complejo MHC II funcional sobre la superficie de una célula del animal. En una realización, una porción no humana del polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor comprende los dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido α del MHC II endógeno de roedor. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor se expresa bajo el control regulador del promotor α del MHC II endógeno de roedor y elementos reguladores. En una realización, la porción humana del polipéptido quimérico se deriva de una proteína HLA de clase II humana seleccionada entre el grupo que consiste en HLA-DR, HLA-DQ, y HLA-DP, por ejemplo, la porción humana se deriva de la proteína HLA-DR4. El roedor puede ser un ratón. En un aspecto, el roedor que comprende, en un locus del gen α del MHC II endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor además comprende, en un locus del gen β del MHC II endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor. Se proporciona también en la presente memoria un método de obtención de un roedor modificado genéticamente que comprende, en un locus de un gen α del MHC II endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor. Dicho método puede comprender sustituir, en un locus de un gen α del MHC II endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido α del MHC II endógeno de roedor por una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor.

Se proporciona también en la presente memoria un roedor que comprende, en un locus de un gen α del MHC II endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor. En una realización, una porción humana de dicho polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor comprende un dominio β extracelular del MHC II humano en donde el dominio β extracelular del MHC II humano en el animal comprende los dominios $\beta 1$ y $\beta 2$ del MHC II humano. El roedor expresa un complejo MHC II funcional sobre la superficie de una célula del animal. En una realización, una porción de roedor del polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor comprende los dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido β del MHC II endógeno de roedor. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor se expresa bajo el control regulador del promotor β del MHC II endógeno de roedor y elementos reguladores. En una realización, la porción humana del polipéptido quimérico se deriva de una proteína HLA de clase II humana seleccionada del grupo que consiste en HLA-DR, HLA-DQ, y HLA-DP, por ejemplo, la porción humana se deriva de la proteína HLA-DR4. El roedor puede ser un ratón. En un aspecto, el animal roedor que comprende, en un locus del gen β del MHC II endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor además comprende, en un locus del gen α del MHC II endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor. Se proporciona también en la presente memoria un método para obtener un roedor modificado genéticamente que comprende, en un locus de un gen β del MHC II endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor. Dicho método puede comprender sustituir, en un locus de un gen β del MHC II endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido β del MHC II endógeno de roedor por una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor.

En un aspecto, se proporciona un roedor que comprende, en un locus de un gen del MHC II endógeno, una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor, en donde una porción humana del polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor comprende un dominio α extracelular del MHC II humano y una porción humana del polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor comprende un dominio β extracelular del MHC II humano, en donde el dominio α extracelular del MHC II humano comprende los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ humanos del MHC II humano, y el dominio β extracelular del MHC II humano comprende los dominios $\beta 1$ y $\beta 2$ del MHC II humano. Los polipéptidos α y β del MHC II quimérico de humano/roedor forman un complejo MHC II quimérico funcional (por ejemplo, el complejo MHC II de humano/roedor) sobre la superficie de una célula. En diversos aspectos, la primera secuencia de nucleótidos se expresa bajo el control regulador del promotor α del MHC II endógeno de roedor y elementos reguladores. En diversos aspectos, la segunda secuencia de nucleótidos se expresa bajo el control regulador del promotor β del MHC II

endógeno de roedor y elementos reguladores. En algunas realizaciones, una porción de roedor del polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor comprende los dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido α del MHC II endógeno de roedor. En algunas realizaciones, una porción de roedor del polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor comprende los dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido β del MHC II endógeno de roedor.

En la invención, el animal no humano es un roedor, y las porciones humanas de los polipéptidos α y β del MHC II quimérico de humano/roedor comprenden secuencias humanas derivadas de la proteína HLA de clase II seleccionada del grupo que consiste en HLA-DR, HLA-DQ, y HLA-DP. En algunas realizaciones de la invención, las porciones humanas de las secuencias de α y β del MHC II quimérico de humano/roedor se derivan de una secuencia de HLA-DR4 humana; por tanto, la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio α extracelular del MHC II se deriva de una secuencia de un gen HLA-DR α *01, y la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio β extracelular del MHC II se deriva de una secuencia que codifica un gen HLA-DR β 1*04.

En diversas realizaciones de la invención, la primera y la segunda secuencias de nucleótidos se encuentran en el mismo cromosoma. En algunos aspectos, el animal comprende dos copias del locus MHC II que contiene las secuencias de nucleótidos primera y segunda, mientras que, en otros aspectos, el animal comprende una copia del locus MHC II que contiene las secuencias primera y segunda de nucleótidos. De este modo, el animal puede ser homocigótico o heterocigótico para el locus MHC II que contiene la primera y la segunda secuencias de nucleótidos.

En algunos aspectos, el polipéptido α del MHC II quimérico y/o el polipéptido β del MHC II quimérico están unidos operativamente a una secuencia líder no humana.

En una realización, el roedor se selecciona del grupo que consiste en un ratón y una rata. De este modo, en algunas realizaciones, las secuencias no humanas de los genes α y β del MHC II quimérico se derivan de secuencias de nucleótidos que codifican la proteína del MHC II de ratón, por ejemplo, una proteína H-2E de ratón. En una realización, el roedor (por ejemplo, el ratón o la rata) de la invención no expresa los polipéptidos endógenos funcionales del MHC II a partir de sus loci endógenos. En una realización, en donde el roedor es un ratón, el ratón no expresa los polipéptidos H-2E y H-2A endógenos funcionales a partir de sus loci endógenos.

De este modo, en algunas realizaciones, se proporciona un ratón que comprende, en un locus MHC II endógeno de ratón una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor, en donde la porción humana del polipéptido α del MHC II quimérico comprende un dominio extracelular derivado de un polipéptido α de una proteína HLA-DR4 humana, y una porción humana del polipéptido β del MHC II quimérico de humano/ratón comprende un dominio extracelular derivado de un polipéptido β de una proteína HLA-DR4 humana, en donde una porción de ratón del polipéptido α del MHC II quimérico comprende los dominios transmembrana y citoplásmicos de una cadena α de H-2E de ratón, y una porción de ratón del polipéptido β del MHC II quimérico comprende los dominios transmembrana y citoplásmicos de una cadena β de H-2E de ratón, y en donde el ratón expresa un complejo HLA-DR4/H-2E MHC II quimérico funcional. En algunos aspectos, el dominio extracelular del polipéptido α del MHC II quimérico comprende los dominios α 1 y α 2 humanos; en algunos aspectos, el dominio extracelular del polipéptido β del MHC II quimérico comprende los dominios β 1 y β 2 humanos. En algunas realizaciones, la primera secuencia de nucleótidos se expresa bajo el control regulador del promotor α del MHC II endógeno de ratón y elementos reguladores, y la segunda secuencia de nucleótidos se expresa bajo el control regulador del promotor β del MHC II endógeno de ratón y elementos reguladores. En varias realizaciones, el ratón no expresa polipéptidos endógenos funcionales del MHC II, por ejemplo, los polipéptidos H-2E y H-2A, a partir de sus loci endógenos. En algunos aspectos, el ratón comprende dos copias del locus MHC II que contienen la primera y la segunda secuencias de nucleótidos, mientras que, en otros aspectos, el ratón comprende una copia del locus MHC II que contiene la primera y la segunda secuencias de nucleótidos.

Se proporcionan también métodos para obtener roedores diseñados mediante ingeniería genética, por ejemplo, ratones o ratas como se describe en la presente memoria. En varias realizaciones, los roedores, por ejemplo, los ratones o ratas de la invención, se obtienen sustituyendo secuencias endógenas del MHC II por secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos α y β del MHC II quimérico de humano/roedor (por ejemplo, humano/ratón). En una realización, la invención proporciona un método de modificación de un locus MHC II de un roedor (por ejemplo, un ratón o una rata) para expresar un complejo MHC II quimérico de humano/roedor que comprende sustituir, en un locus MHC II endógeno de ratón, una secuencia de nucleótidos que codifica un complejo MHC II de roedor por una secuencia de nucleótidos que codifica un complejo MHC II quimérico de humano/roedor. En un aspecto del método, la secuencia de nucleótidos que codifica el complejo MHC II quimérico de humano/roedor comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de una cadena α del MHC II humano, y dominios transmembrana y citoplásmicos de una cadena α del MHC II de roedor, y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de una cadena β del MHC II humano y dominios transmembrana y citoplásmicos de una cadena β del MHC II de roedor. En algunos aspectos, una porción de roedor del complejo MHC II quimérico se deriva de una proteína H-2E de ratón, y una porción humana se deriva de una proteína HLA-DR4 humana. En algunas realizaciones, la sustitución de los loci MHC II endógenos descrita en la presente memoria se realiza en una única célula ES, y la

única célula ES se introduce en un embrión de roedor (por ejemplo, ratón o rata) para obtener un roedor modificado genéticamente (por ejemplo, un ratón o rata).

5 Se describen también en la presente memoria células, por ejemplo, células presentadoras de antígenos aisladas, derivadas de los roedores, por ejemplo, los ratones o ratas descritos en la presente memoria. Se describen también tejidos y embriones derivados de los roedores.

10 Las realizaciones y aspectos descritos en la presente memoria se pueden utilizar de forma combinada, salvo que se indique lo contrario o lo contrario resulte evidente a partir del contexto. Otras realizaciones serán evidentes para el experto en la técnica a partir de una revisión de la descripción detallada que sigue a continuación. La siguiente descripción detallada incluye representaciones ilustrativas de diversas realizaciones de la invención, que no son restrictivas de la invención según se ha reivindicado. Las figuras adjuntas constituyen una parte de esta memoria descriptiva y, junto con la descripción, sirven solo para ilustrar las realizaciones y no para limitar la invención.

15 Breve descripción de los dibujos

La **Fig. 1** es un dibujo esquemático de la molécula del MHC de clase II expresada sobre la superficie de una célula presentadora de antígenos (APC), que contiene cuatro dominios: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, y $\beta 2$. El círculo gris representa un enlace peptídico en la hendidura de unión al péptido.

20 La **Fig. 2** es una representación esquemática (no hecha a escala) de la estructura genómica relativa del HLA humano, que muestra los genes de clase I, II y III.

La **Fig. 3** es una representación esquemática (no hecha a escala) de la estructura genómica relativa del MHC de ratón, que muestra los genes de clase I, II y III.

La **Fig. 4 (A-D)** es una ilustración esquemática (no hecha a escala) de la estrategia para generar un vector director que comprende los I-E β e I-E α humanizados (es decir, las quimeras H-2E β /HLA-DR $\beta 1^*04$ y H-2E α /HLA-DR α^*01 , respectivamente). En la Fig. 4C, la secuencia del MHC II humanizado final de la Fig. 4B se liga entre los sitios de restricción P1-SceI y I-CeuI de la construcción final de la Fig. 4A, para generar una construcción que comprende el MHC II humanizado y el exón 1 de I-E α derivado de BALB/c. Pg=pseudogén; BHR= recombinación homóloga bacteriana; CM=cloranfenicol; spec=espectinomicina; hig=higromicina; neo=neomicina; EP=electroporación. Los triángulos representan exones, los triángulos rellenos representan exones de ratón derivados de ratones C57BL/6 (con la excepción de los triángulos rayados, que representan el exón 1 de I-E α derivado de ratones BALB/c) y los triángulos vacíos representan exones humanos.

La **Fig. 5** muestra una ilustración esquemática, no hecha a escala, de los genes I-E e I-A del MHC de clase II, que muestra la inactivación genética del locus de ratón utilizando un casete de higromicina, seguido por la introducción de un vector que comprende un I-E β y un I-E α humanizados (es decir, las quimeras H-2E β /HLA-DR $\beta 1^*04$ y H-2E α /HLA-DR α^*01 , respectivamente). Los triángulos vacíos representan exones humanos; los triángulos rellenos representan exones de ratón. Las sondas utilizadas para la genotipación están rodeadas por un círculo.

La **Fig. 6** muestra una ilustración esquemática, no hecha a escala, de la eliminación mediada por Cre del casete de neomicina de la Fig. 5. Los triángulos vacíos representan exones humanos; los triángulos rellenos representan exones de ratón. Las dos hebras superiores representan los loci MHC II de un ratón heterocigótico con MHC II humanizado que albergan un casete de selección de neomicina, y las dos hebras inferiores representan los loci MHC II de un ratón heterocigótico con MHC II humanizado al que se ha retirado el casete de neomicina.

La **Fig. 7** muestra una ilustración esquemática comparativa, no hecha a escala, de loci de clase II de ratón y humano. Los genes de clase II se representan en recuadros, y los recuadros vacíos representan pseudogenes. Se incluyen los tamaños relativos (kb) de diversos fragmentos de ácidos nucleicos.

La **Fig. 8**, en el panel de la izquierda, es una ilustración esquemática (no hecha a escala) de la estrategia de humanización para la cadena α del MHC II; en particular, la figura muestra una sustitución de los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ codificados por los exones 2 y 3 del gen α del MHC II, pero reteniendo a la vez las secuencias de la cola transmembrana y citoplásmica de ratón. En el locus humanizado, la secuencia líder α del MHC II se deriva de la hebra de BALB/c de ratón. El panel de la derecha ilustra la humanización de la cadena β del MHC II; en particular, la figura muestra una sustitución de los dominios $\beta 1$ y $\beta 2$, codificados por los exones 2 y 3 del gen β del MHC II, pero reteniendo a la vez la secuencia líder de ratón y las secuencias de la cola citoplásmica y de transmembrana de ratón. Toda la fila superior está compuesta por secuencias humanas; toda la fila intermedia está constituida por secuencias de ratón; toda la fila inferior está constituida por secuencias humanizadas, con los exones 2 y 3 derivados de los genes HLA-DR humanos.

La **Fig. 9** muestra el análisis FACS con anticuerpo dirigido contra HLA-DR de los linfocitos B procedentes de un ratón heterocigótico para una HLA-DR4 quimérica (casete neo eliminado) en presencia (1681HET + poli (I:C)) o ausencia (1681HET) de poli (I:C), y un ratón silvestre (ratón WT).

5 Descripción detallada de la invención

Definiciones

La presente invención proporciona roedores modificados genéticamente (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, etc.) que expresan el polipéptido del MHC II humano o humanizado; así como los métodos de preparación del mismo;

Salvo que se defina de otra manera, todos los términos y expresiones utilizados en la presente memoria incluyen los significados que los términos y expresiones han adquirido en la técnica, a no ser que lo contrario se indique o se evidencie claramente a partir del contexto en el que se usa el término o expresión.

El término “conservativo”, cuando se usa para describir una sustitución de aminoácido conservativa, incluye la sustitución de un resto aminoácido por otro resto aminoácido que tiene un grupo R en la cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). Pueden conseguirse sustituciones de aminoácidos conservativas modificando una secuencia de nucleótidos de forma que se introduzca un cambio de nucleótido que codificará la sustitución conservativa. En general, una sustitución de aminoácidos conservativa no cambiará prácticamente las propiedades funcionales de interés de una proteína, por ejemplo, la capacidad del MHC II de presentar un péptido de interés. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen cadenas laterales alifáticas tales como glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; cadenas laterales alifáticas de hidroxilo tales como serina y treonina; cadenas laterales que contienen amida tales como asparagina y glutamina; cadenas laterales aromáticas tales como fenilalanina, tirosina, y triptófano; cadenas laterales básicas tales como lisina, arginina, e histidina; cadenas laterales ácidas tales como ácido aspártico y ácido glutámico; y, cadenas laterales que contienen azufre tales como cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservativos incluyen, por ejemplo, valina/leucina/isoleucina, fenilalanina/tirosina, lisina/arginina, alanina/valina, glutamato/aspartato, y asparagina/glutamina. En algunas realizaciones, una sustitución de aminoácido conservativa puede ser una sustitución de cualquier resto natural en una proteína por alanina, como se usa en, por ejemplo, la mutagénesis de barrido de alanina. En algunas realizaciones, se realiza una sustitución conservativa que tiene un valor positivo en la matriz de verosimilitud PAM250 descrita en Gonnet y col. ((1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256:1443-45). En algunas realizaciones, la sustitución es una sustitución moderadamente conservativa en donde la sustitución tiene un valor no negativo en la matriz de verosimilitud PAM250.

De este modo, también queda abarcado por la invención un roedor modificado genéticamente cuyo genoma comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido MHC II humano o humanizado, en donde el polipéptido comprende sustituciones de aminoácidos conservativas en la secuencia de aminoácidos descrita en la presente memoria.

El experto en la técnica entendería que, además de los restos de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido del MHC II humano o humanizado descrito en la presente memoria, debido a la degeneración del código genético, otros ácidos nucleicos pueden codificar el polipéptido de la descripción. Por tanto, además de un roedor modificado genéticamente que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del MHC II con sustituciones de aminoácidos conservativas, se proporciona también un roedor cuyo genoma comprende una secuencia de nucleótidos que difiere de la descrita en la presente memoria debido a la degeneración del código genético.

El término “identidad”, cuando se usa junto con la secuencia, incluye la identidad según se determina mediante varios algoritmos diferentes conocidos en la técnica que se pueden usar para medir la identidad de la secuencia de nucleótidos y/o la de aminoácidos. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, las identidades se determinan usando una alineación ClustalW v. 1.83 (lenta) que utiliza una penalización por apertura de hueco de 10,0, y una penalización por extensión de hueco de 0,1, y que utiliza una matriz de similitud Gonnet (MacVector™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008). La longitud de las secuencias comparadas con respecto a la identidad de las secuencias dependerá de las secuencias concretas. En varias realizaciones, la identidad se determina comparando la secuencia de una proteína madura desde su extremo N a su extremo C. En diversas realizaciones, cuando se compara una secuencia quimérica de humano/roedor con una secuencia humana, la porción humana de la secuencia quimérica de humano/roedor (pero no la porción no humana), se usa en la realización de la comparación con el fin de discernir un nivel de identidad entre una secuencia humana y una porción humana de una secuencia quimérica de humano/roedor (por ejemplo, mediante la comparación de un ectodominio humano de una proteína quimérica de humano/ratón con un ectodominio humano de una proteína humana).

Los términos “homología” u “homólogo” en referencia a las secuencias, por ejemplo, secuencias de nucleótidos o aminoácidos, significan dos secuencias que, tras la alineación y comparación óptimas, son idénticas en al menos

aproximadamente 75 % de los nucleótidos o los aminoácidos, al menos aproximadamente 80 % de los nucleótidos o aminoácidos, al menos aproximadamente 90-95 % nucleótidos o aminoácidos, por ejemplo, más del 97 % de nucleótidos o aminoácidos. El experto en la técnica entendería que, para el direccionamiento óptimo del gen, la construcción directora debe contener brazos homólogos de las secuencias de ADN endógeno (es decir, “brazos de homología”); por tanto, puede producirse la recombinación homóloga entre la construcción directora y la secuencia endógena diana.

El término “unido operativamente” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos de esta forma están en una relación que les permite funcionar en su manera prevista. De esta forma, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína puede estar unida de manera operativa a secuencias reguladoras (por ejemplo, secuencia promotora, potenciadora, silenciadora, etc.) con el fin de retener la regulación de la transcripción adecuada. Además, diversas porciones de la proteína quimérica o humanizada pueden unirse operativamente para retener el plegamiento, procesamiento, direccionamiento, y expresión adecuados, y otras propiedades funcionales de la proteína en la célula. Salvo que se indique otra cosa, diversos dominios de la proteína quimérica o humanizada descrita en la presente memoria están unidos operativamente entre sí.

Los términos “complejo MHC II”, “proteína del MHC II”, o similares, como se utiliza en la presente memoria, incluyen el complejo entre un polipéptido α del MHC II y un polipéptido β del MHC II. El término “polipéptido α del MHC II” o “polipéptido β del MHC II” (o similares), como se utiliza en la presente memoria, incluye solamente el polipéptido α del MHC I o solamente el polipéptido β del MHC II, respectivamente. De manera similar, las expresiones “complejo HLA-DR4”, “proteína HLA-DR4”, “complejo H-2E”, “proteína H-2E”, o similares, se refieren al complejo entre los polipéptidos α y β . Normalmente, los términos “MHC humano” y “HLA” se usan de manera indistinta.

El término “sustitución” en referencia a la sustitución de un gen se refiere a la colocación de un material genético exógeno en un locus genético endógeno, sustituyendo de este modo la totalidad o porción del gen endógeno por una secuencia de ácido nucleico ortóloga u homóloga. Como se demuestra en los ejemplos siguientes, la secuencia de ácido nucleico del locus MHC II endógeno se sustituyó por una secuencia de nucleótidos que comprende secuencias que codifican porciones de los polipéptidos α y β del MHC II humano; específicamente, que codifican las porciones extracelulares de los polipéptidos α y β del MHC II.

“Funcional” como se utiliza en la presente memoria, por ejemplo, en referencia a un polipéptido funcional, se refiere a un polipéptido que retiene al menos una actividad biológica normalmente asociada con la proteína natural. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la invención, una sustitución en un locus endógeno (por ejemplo, la sustitución en un locus MHC II endógeno no humano) da como resultado un locus que no puede expresar un polipéptido endógeno funcional.

Animales con el MHC II modificado genéticamente

En diversos aspectos, la invención proporciona generalmente roedores modificados genéticamente que comprenden en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un complejo MHC II humano o humanizado; por tanto, los animales expresan un complejo MHC II humano o humanizado (por ejemplo, los polipéptidos α y β del MHC II).

Los genes del MHC se clasifican en tres clases: clase I, clase II, y clase III, todas ellas codificadas tanto por el cromosoma 6 humano como por el cromosoma 17 de ratón. Un esquema de la organización relativa de las clases del MHC humano y de ratón se presenta en las Fig. 2 y 3, respectivamente. La mayoría de los genes del MHC son polimórficos, de hecho, son los genes más polimórficos de los genomas de ratón y humano. Se supone que los polimorfismos del MHC son importantes para proporcionar una ventaja evolutiva; los cambios en la secuencia pueden dar como resultado diferencias en la unión peptídica que permitan una mejor presentación del antígeno. Una excepción es la cadena HLA-DR α humana y su homóloga de ratón, E α (es decir, H-2E α), que son monomórficas.

El complejo MHC de clase II comprende dos dominios asociados no covalentemente: una cadena α y una cadena β , denominadas también en la presente memoria como polipéptido α y polipéptido β (Fig. 1). La proteína atraviesa la membrana plasmática; por tanto, contiene un dominio extracelular, un dominio transmembrana, y un dominio citoplásmico. La porción extracelular de la cadena α contiene los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, y la porción extracelular de la cadena β contiene los dominios $\beta 1$ y $\beta 2$. Los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ forman una hendidura de unión a péptido sobre la superficie celular. Debido a la confirmación tridimensional de la hendidura de unión a péptido del complejo MHC II, no existe teóricamente límite superior de la longitud del antígeno unido, pero de forma típica los péptidos presentados por el MHC II tienen entre 13 y 17 aminoácidos de longitud.

Además de su interacción con los péptidos antigénicos, la hendidura de unión a péptido de la molécula del MHC II interactúa con la cadena invariante (Ii) durante los procesos de formación del complejo MHC II y la adquisición del péptido. Los dímeros α/β del MHC II se ensamblan en el retículo endoplásmico y se asocian con la cadena Ii, que es responsable del control de la unión al péptido y del direccionamiento del MHC II a la ruta endocítica. En el endosoma, Ii experimenta la proteólisis, y un pequeño fragmento de Ii, el péptido de cadena invariante asociado a la clase II (CLIP), permanece en la hendidura de unión al péptido. En el endosoma, bajo el control de HLA-DM (en seres humanos), CLIP se intercambia por los péptidos antigénicos.

MHC II interactúa con el correceptor CD4 de linfocitos T en la hendidura hidrófoba en la unión entre los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$. Wang y Reinherz (2002) Structural Basis of T Cell Recognition of Peptides Bound to MHC Molecules, *Molecular Immunology*, 38:1039-49. Cuando el CD4 y el receptor de linfocitos T se unen a la misma molécula del MHC II acomplejada con un péptido, la sensibilidad del linfocito T al antígeno aumenta, y se necesita una cantidad 100 veces menor de antígeno para la activación. Ver, Janeway's Immunobiology, 7^a ed., Murphy y col. eds., Garland Science, 2008.

Se han propuesto numerosas funciones de los dominios transmembrana y citoplásmico del MHC II. En el caso del dominio citoplásmico, se ha demostrado su importancia en la señalización intracelular, el tráfico con la membrana plasmática, y finalmente, la presentación del antígeno. Por ejemplo, se ha demostrado que los hibridomas de linfocitos T responden muy mal a las células presentadoras de antígenos (APC) transfectadas con cadenas β del MHC II truncadas en el dominio citoplásmico, y la inducción de la diferenciación de los linfocitos B se ve impedida. Ver, por ejemplo, Smiley y col. (1996) Truncation of the class II β -chain cytoplasmic domain influences the level of class II/invariant chain-derived peptide complexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:241-44. El truncamiento de las moléculas de Clase II parece perjudicar la producción de AMPc. Se ha postulado que la delección de la cola citoplásmica del MHC II afecta el tráfico intracelular, evitando por tanto que el complejo encuentre antígenos relevantes en la ruta endocítica. Smiley y col. (anteriormente citado) demostraron que el truncamiento de las moléculas de clase II en el dominio citoplásmico reduce el número de complejos CLIP/clase II, postulando que esto afecta a la capacidad de CLIP de regular eficazmente la presentación del antígeno.

Se ha hipotetizado que, como la agrupación del MHC II es importante para la estimulación del receptor de los linfocitos T (TCR), si se evitara que las moléculas del MHC II truncadas en el dominio citoplásmico se unieran al citoesqueleto y, por lo tanto, su agregación, la presentación del antígeno a los linfocitos T se vería afectada. Ostrand-Rosenberg y col. (1991) Abrogation of Tumorigenicity by MHC Class II Antigen Expression Requires the Cytoplasmic Domain of the Class II Molecule, *J. Immunol.* 147:2419-22. De hecho, se mostró recientemente que la HLA-DR truncada en el dominio citoplásmico no pudo asociarse con el citoesqueleto tras la oligomerización. El Fakhy y col. (2004) Delineation of the HLA-DR Region and the Residues Involved in the Association with the Cytoskeleton, *J. Biol. Chem.* 279:18472-80. De forma importante, la actina del citoesqueleto es un sitio de actividad localizada de transducción de la señal, que puede afectar la presentación del antígeno. Además de la asociación con el citoesqueleto, recientes estudios han demostrado también que hasta un 20 % de todas las moléculas de HLA-DR se encuentran presentes en las balsas lipídicas de las APC, que son microdominios ricos en colesterol y glicoesfingolípidos, y que dicha localización es importante para la presentación del antígeno, la formación de la sinapsis inmunitaria, y la señalización mediada por el MHC II. Ver, por ejemplo, Dolan y col. (2004) Invariant Chain and the MHC II Cytoplasmic Domains Regulate Localization of MHC Class II Molecules to Lipid Rafts in Tumor Cell-Based Vaccines, *J. Immunol.* 172:907-14. Dolan y col. lo que sugiere que el truncamiento del dominio citoplásmico del MHC II reduce la localización constitutiva del MHC II en las balsas lipídicas.

Además, el dominio citoplásmico del MHC II, en particular la cadena β , contiene un resto de leucina que se somete a ubiquitinación por la ubiquitina ligasa, RING-CH I asociada a membrana (MARCH I), que controla el tráfico endocítico, la internalización, y la degradación del MHC II; y se ha mostrado que la ubiquitinación mediada por MARCH cesa tras la maduración de células dendríticas que da como resultado niveles mayores del MHC II en la membrana plasmática. Shin y col. (2006) Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination, *Nature* 444:115-18; De Gassart y col. (2008) MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:3491-96.

Los dominios transmembrana de las cadenas α y β del MHC II interactúan entre sí y esta interacción es importante para el ensamblaje adecuado del complejo MHC de clase II. Cosson y Bonifacino (1992) Role of Transmembrane Domain Interactions in the Assembly of Class II MHC Molecules, *Nature* 258:659-62. De hecho, Las moléculas del MHC II en las que los dominios transmembrana de las cadenas α y β se sustituyeron por la cadena α del receptor de IL-2 quedaron retenidas en el ER y apenas fueron detectables en la superficie celular. *Id.* A través de los estudios de mutagénesis, se ha descubierto que los restos Gly conservados en los dominios transmembrana α y β eran responsables del ensamblaje del MHC II en la superficie celular. *Id.* De este modo, ambos dominios, transmembrana y citoplásmico, son cruciales para el funcionamiento correcto del complejo MHC II.

En varias realizaciones, la invención proporciona un roedor modificado genéticamente (por ejemplo, ratón, rata, etc.) que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un complejo MHC II humano o humanizado, por ejemplo, uno o varios polipéptidos α y/o β del MHC II humano o humanizado. El roedor puede comprender en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un complejo MHC II que es parcialmente humano y parcialmente de roedor, por ejemplo, un roedor que expresa un complejo MHC II quimérico de humano/roedor (por ejemplo, un roedor que expresa polipéptidos α y β del MHC II quimérico de humano/roedor). En un aspecto, el roedor solo expresa el complejo MHC II humano o humanizado, por ejemplo, un complejo MHC II quimérico de humano/roedor, y no expresa un complejo MHC II endógeno no humano a partir de un locus MHC II endógeno. En algunas realizaciones, el animal no puede expresar cualquier complejo MHC II endógeno de roedor a partir de un locus MHC endógeno, sino que expresa solamente el complejo MHC II humano o humanizado. En varias realizaciones, el roedor modificado

genéticamente (por ejemplo, ratón, rata, etc.) comprende en su línea germinal una secuencia de nucleótidos que codifica un complejo MHC II humano o humanizado, por ejemplo, uno o varios polipéptidos α y/o β del MHC II humano o humanizado.

5 En un aspecto, se describe en la presente memoria un complejo MHC II quimérico de humano/roedor. En un ejemplo, el complejo MHC II quimérico de humano/roedor comprende un polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor y un polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor. En un aspecto, una porción humana del polipéptido α del MHC II quimérico y/o una porción humana del polipéptido β del MHC II quimérico comprende un dominio de unión a péptido de un polipéptido α del MHC II humano y/o un polipéptido β del MHC II humano, respectivamente. En un aspecto, una porción humana del polipéptido α y/o β del MHC II quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido α y/o β del MHC II humano, respectivamente. En un ejemplo, una porción humana del polipéptido α del MHC II quimérico comprende un dominio $\alpha 1$ de un polipéptido α del MHC II humano; en otro ejemplo, una porción humana del polipéptido α del MHC II quimérico comprende los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de un polipéptido α del MHC II humano. En un ejemplo adicional, una porción humana del polipéptido β del MHC II quimérico comprende un dominio $\beta 1$ de un polipéptido β del MHC II humano; en otro ejemplo, una porción humana del polipéptido β del MHC II quimérico comprende los dominios $\beta 1$ y $\beta 2$ de un polipéptido β del MHC II humano.

20 La porción humana de los polipéptidos α y β del MHC descritos en la presente memoria puede ser codificada por cualquiera de los loci HLA-DP, HLA-DQ, y HLA-DR. Una lista de antígenos y alelos de HLA habitualmente utilizados se describe en Shankarkumar y col. ((2004) The Human Leukocyte Antigen (HLA) System, Int. J. Hum. Genet. 4(2):91-103). Shankarkumar y col. también presentan una breve explicación de la nomenclatura de HLA utilizada en la técnica. Se puede encontrar información adicional con respecto a la nomenclatura de HLA y diversos alelos de HLA en Holdsworth y col. (2009) The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens, Tissue Antigens 73:95-170, y una reciente actualización de Marsh y col. (2010) Nomenclature for factors of the HLA system, 2010, Tissue Antigens 75:291-455, ambos. De este modo, el polipéptido MHC II humano o humanizado puede derivarse de cualquiera de las moléculas de HLA funcionales humanas descritas en dichas referencias.

30 En un aspecto específico, las porciones humanas del complejo MHC II humanizado descrito en la presente memoria se derivan de HLA-DR humana, por ejemplo, HLA-DR4. Normalmente, las cadenas α de HLA-DR son monomórficas, por ejemplo, la cadena α del complejo HLA-DR está codificada por el gen HLA-DRA (por ejemplo, el gen HLA-DR α *01). Por otro lado, la cadena β de HLA-DR es polimórfica. De este modo, HLA-DR4 comprende una cadena α codificada por el gen HLA-DRA y una cadena β codificada por el gen HLA-DRB1 (por ejemplo, el gen HLA-DR β 1*04). Tal como se describe en la presente memoria a continuación, HLA-DR4 es conocido por estar asociado con la incidencia de numerosas enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, artritis reumatoide, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, etc. En un ejemplo, el alelo HLA-DRA es un alelo HLA-DR α *01, por ejemplo, HLA-DR α *01:01:01:01. En otro ejemplo, el alelo HLA-DRB es HLA-DR β 1*04, por ejemplo, HLA-DR β 1*04:01:01. Aunque los presentes Ejemplos describen estas secuencias de HLA concretas; todas las secuencias de HLA-DR adecuadas están abarcadas en la presente memoria, por ejemplo, las variantes polimórficas presentadas en la población humana, las secuencias con una o más modificaciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, las secuencias de ácidos nucleicos que difieren de las secuencias descritas en la presente memoria debido a la degeneración del código genético, etc.

45 Las porciones humanas del complejo MHC II humanizado pueden codificarse por secuencias de nucleótidos de alelos del HLA conocidos por estar asociados con enfermedades humanas comunes. Dichos alelos del HLA incluyen, aunque no de forma limitativa, HLA-DRB1*0401, -DRB1*0301, -DQA1*0501, -DQB1*0201, DRB1*1501, -DRB1*1502, -DQB1*0602, -DQA1*0102, -DQA1*0201, -DQB1*0202, -DQA1*0501, y combinaciones de los mismos. Para obtener un resumen de las asociaciones entre alelos de HLA y enfermedades, ver Bakker y col. (2006) A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC, Nature Genetics 38:1166-72 e Información Suplementaria.

55 En un aspecto, una porción de roedor del complejo MHC II quimérico de humano/roedor comprende dominios transmembrana y/o citoplásmicos de un complejo MHC II endógeno de roedor, por ejemplo, ratón, rata, etc. De este modo, una porción de roedor del polipéptido α quimérico de humano/roedor puede comprender dominios transmembrana y/o citoplásmicos de un polipéptido α del MHC II endógeno no humano. Una porción de roedor del polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor puede comprender dominios transmembrana y/o citoplásmicos de un polipéptido β del MHC II endógeno de roedor. En un aspecto, el animal es un ratón, y las porciones no humanas de los polipéptidos α y β quiméricos se derivan de una proteína H-2E de ratón. De este modo, las porciones no humanas de los polipéptidos α y β quiméricos pueden comprender dominios transmembrana y citoplásmicos derivados de una proteína H-2E de ratón. Aunque se contemplan secuencias de H-2E específicas en los Ejemplos, todas las secuencias adecuadas, por ejemplo, las variantes polimórficas, las sustituciones de aminoácidos conservativas y no conservativas, etc., están abarcadas en la presente memoria.

65 En diversos aspectos de la invención, la(s) secuencia(s) que codifican un complejo MHC II quimérico de humano/roedor se encuentran en un locus MHC II endógeno de roedor (por ejemplo, locus H-2A y/o locus H-2E de

- ratón). En una realización, esto da como resultado la sustitución de uno o varios genes MHC II endógenos o una porción de los mismos con una o varias secuencias de nucleótido que codifican una proteína del MHC II humana o humanizada, por ejemplo, un gen quimérico que codifica una proteína del MHC II quimérica de humano/roedor descrita en la presente memoria. Debido a que las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos α y β del MHC II se localizan unas cerca de otras en el cromosoma, se puede diseñar una sustitución que se dirija a los dos genes, ya sea de forma independiente o de manera conjunta; ambas posibilidades están abarcadas en la presente memoria. En una realización, la sustitución comprende una sustitución de una secuencia de nucleótidos endógena que codifica polipéptidos α y β del MHC II por una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido α del MHC quimérico de humano/roedor y un polipéptido β del MHC quimérico de humano/roedor. En un aspecto, la sustitución comprende sustituir las secuencias de nucleótidos que representan uno o más (por ejemplo, dos) genes MHC II endógenos. De este modo, el roedor contiene una secuencia de nucleótidos quimérica de humano/roedor en un locus MHC II endógeno, y expresa una proteína del MHC II quimérica de humano/roedor a partir del locus endógeno de roedor.
- De este modo, se proporciona en la presente memoria un roedor que comprende, en un locus de un gen MHC II endógeno, una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor, en donde una porción humana del polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor comprende un dominio α extracelular del MHC II humano y una porción humana del polipéptido β del MHC II quimérico humano/no humano comprende un dominio β extracelular del MHC II humano, y en donde los polipéptidos α del MHC II y β del MHC II quiméricos humanos/no humanos forman un complejo MHC II funcional sobre la superficie de una célula.
- Un polipéptido quimérico humano/no humano puede ser de tal manera que comprenda una secuencia líder (señal) humana o no humana. En una realización, el polipéptido α del MHC II comprende una secuencia líder de roedor de un polipéptido α del MHC II endógeno. En una realización, el polipéptido β del MHC II quimérico comprende una secuencia líder de roedor de un polipéptido β del MHC II endógeno. En una realización alternativa, el polipéptido α del MHC II y/o β del MHC II comprende una secuencia líder de roedor del polipéptido α del MHC II y/o β del MHC II, respectivamente, procedente de otro roedor u otra cepa de ratón. De este modo, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido α del MHC II y/o β del MHC II puede estar unido operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder α del MHC II y/o una secuencia líder β del MHC II, respectivamente. En otra realización más, el polipéptido α del MHC II y/o β del MHC II comprende una secuencia líder humana del polipéptido α del MHC II humano y/o del polipéptido β del MHC II humano, respectivamente (por ejemplo, una secuencia líder de HLA-DRA humano y/o HLA-DR β 1*04 humano, respectivamente).
- Un polipéptido α del MHC II y/o β del MHC II quimérico de humano/roedor puede comprender en su porción humana un dominio extracelular completo o sustancialmente completo de un polipéptido α del MHC II humano y/o un polipéptido β del MHC II humano, respectivamente. De este modo, una porción humana puede comprender al menos 80 %, preferiblemente al menos 85 %, más preferiblemente al menos 90 %, por ejemplo, 95 %, o más, de los aminoácidos que codifican un dominio extracelular de un polipéptido α del MHC II humano y/o β del MHC II humano (por ejemplo, HLA-DRA humano y/o HLA-DR β 1*04 humano). En un ejemplo, el dominio extracelular prácticamente completo del polipéptido α del MHC II y/o el polipéptido β del MHC II humano carece de una secuencia líder humana. En otro ejemplo, el polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor y/o el polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor comprende una secuencia líder humana.
- Por otra parte, el polipéptido α del MHC II y/o el polipéptido β del MHC II quiméricos pueden expresarse bajo el control del promotor endógeno y los elementos reguladores de roedor, por ejemplo, los elementos reguladores de α del MHC II y/o β del MHC II de ratón, respectivamente. Dicha disposición facilitará la expresión adecuada de los polipéptidos MHC II quiméricos en el roedor, por ejemplo, durante la respuesta inmunitaria del roedor.
- Un animal no humano modificado genéticamente puede ser un ratón, rata, conejo, cerdo, bovino (por ejemplo, vaca, toro, búfalo), ciervo, oveja, cabra, pollo, gatos, perro, hurón, primate (por ejemplo, tití común, macaco). Para los roedores cuyas células ES genéticamente modificables adecuadas no estén fácilmente disponibles, se emplean otros métodos para obtener un roedor que comprenda la modificación genética. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, modificar el genoma de una célula no ES (por ejemplo, un fibroblasto o una célula pluripotente inducida) y emplear la transferencia nuclear para transferir el genoma modificado a una célula adecuada, por ejemplo, un oocito, y gestar la célula modificada (por ejemplo, el oocito modificado) en un roedor en las condiciones adecuadas para formar un embrión.
- En un aspecto, el no roedor es de la superfamilia Dipodoidea o Muroidea. En una realización, el roedor se selecciona entre un ratón, una rata, y un hámster. En una realización, el roedor se selecciona de la superfamilia Muroidea. En una realización, el animal modificado genéticamente procede de una familia seleccionada entre Calomyscidae (por ejemplo, hámsteres similares a ratones), Cricetidae (por ejemplo, hámster, ratas y ratones del Nuevo Mundo, topillos), Muridae (ratones y ratas auténticos, jerbos, ratones espinosos, ratas de crin), Nesomyidae (ratones trepadores, ratones de abazón de las rocas, ratas coliblancas, ratas y ratones de Madagascar), Platacanthomyidae (por ejemplo, lirón espinoso de Malabar), y Spalacidae (por ejemplo, ratas topo, ratas de bambú, y zocos). En una realización específica, el roedor

genéticamente modificado se selecciona entre un ratón o rata auténtico (familia Muridae), un jerbo, un ratón espinoso, y una rata de crin. En una realización, el ratón genéticamente modificado es un miembro de la familia Muridae. En una realización, el animal es un roedor. En una realización específica, el roedor se selecciona entre un ratón y una rata. En una realización, el roedor es un ratón.

5 En una realización específica, el roedor es un ratón de la cepa C57BL seleccionado entre C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, y C57BL/Ola. En otra realización, el ratón es una cepa 129 seleccionada entre el grupo que consiste en una cepa que es 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (por ejemplo, 129S1/SV, 129S1/Svlm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 10 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (ver, por ejemplo, Festing y col. (1999) Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome 10:836, ver también, Auerbach y col. (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines). En una realización específica, el ratón modificado genéticamente es una mezcla de una cepa 129 anteriormente mencionada y una cepa C57BL/6 anteriormente mencionada. En otra realización específica, el ratón es una mezcla de cepas 129 anteriormente mencionadas, o una mezcla de cepas BL/6 anteriormente mencionadas. En una realización específica, la cepa 129 de la mezcla es una cepa 129S6 (129/SvEvTac). En otra realización, el ratón es una cepa BALB, por ejemplo, una cepa BALB/c. En otra realización más, el ratón es una mezcla de una cepa BALB y otra cepa anteriormente mencionada.

20 En una realización, el roedor es una rata. En una realización, la rata se selecciona entre una rata Wistar, una cepa LEA, una cepa Sprague Dawley, una cepa Fischer, F344, F6, y Dark Agouti. En una realización, la cepa de la rata es una mezcla de dos o más cepas seleccionadas entre el grupo que consiste en Wistar, LEA, Sprague Dawley, Fischer, F344, F6, y Dark Agouti.

25 De este modo, en una realización, la invención se refiere a un ratón modificado genéticamente que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un complejo MHC II quimérico de humano/ratón, por ejemplo, polipéptidos α y β del MHC II quimérico de humano/ratón. En una realización, una porción humana del polipéptido α del MHC II quimérico de humano/ratón comprende una unión al péptido α del MHC II humano o dominio extracelular, y una porción humana del polipéptido β del MHC II quimérico de humano/ratón comprende una unión al péptido β MHC II humano o dominio extracelular. En algunas realizaciones, el ratón no expresa una unión al péptido o un dominio 30 extracelular del polipéptido α y/o β endógeno de ratón procedente de un locus endógeno de ratón (por ejemplo, el locus H-2A y/o H-2E). En algunas realizaciones, el ratón comprende un genoma que carece de un gen que codifica una molécula del MHC de clase II funcional que comprende un H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2, H-2Ea, y una combinación de los mismos. El dominio de unión a péptido del polipéptido α del MHC II humano puede comprender un dominio $\alpha 1$, y el dominio de unión a péptido del polipéptido β del MHC II puede comprender un dominio $\beta 1$; por tanto, el dominio de 35 unión a péptido del complejo MHC II quimérico puede comprender los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ humanos. El dominio extracelular del polipéptido α del MHC II humano puede comprender los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, y el dominio extracelular del polipéptido β del MHC II humano puede comprender los dominios $\beta 1$ y $\beta 2$; por tanto, el dominio extracelular del complejo MHC II quimérico puede comprender los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$ humanos. En una realización, la porción de ratón del complejo MHC II quimérico comprende dominios transmembrana y/o citosólicos del MHC II de ratón, por 40 ejemplo, H-2E de ratón (por ejemplo, los dominios transmembrana y citosólicos de las cadenas α y β de H-2E de ratón).

Por tanto, en una realización, se proporciona un ratón genéticamente modificado, en donde el ratón comprende, en un locus MHC II endógeno de ratón una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido β del MHC II quimérico de 45 humano/roedor, en donde una porción humana del polipéptido α del MHC II quimérico comprende un dominio extracelular derivado de un polipéptido α de una proteína HLA-DR4 humana y la porción humana del polipéptido β del MHC II quimérico comprende un dominio extracelular derivado de un polipéptido β de una proteína HLA-DR4 humana, en donde una porción de ratón del polipéptido α del MHC II quimérico comprende los dominios transmembrana y citoplásmicos de una cadena α de H-2E de ratón, y una porción de ratón del polipéptido β del MHC II quimérico comprende los dominios 50 transmembrana y citoplásmicos de una cadena β de H-2E de ratón, y en donde el ratón expresa un complejo HLA-DR4/H-2E MHC II quimérico funcional. En una realización, el complejo HLA-DR4/H-2E MHC II quimérico comprende una cadena α del MHC II que incluye dominios extracelulares (por ejemplo, los dominios $\alpha 1$, y $\alpha 2$) derivados de la proteína HLA-DR4 (dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de HLA-DRA) y los dominios transmembrana y citoplásmicos de una cadena α de H-2E de ratón, así como una cadena β del MHC II que incluye dominios extracelulares (por ejemplo, los dominios $\beta 1$ y $\beta 2$) derivados de HLA-DR4 (y los dominios $\beta 1$ y $\beta 2$ de HLA-DR $\beta 1^*04$) y los dominios transmembrana y citoplásmicos de la cadena β de H-2E de 55 ratón. En un aspecto, el ratón no expresa los polipéptidos H-2A y H-2E endógenos funcionales a partir de sus loci de ratón endógenos (por ejemplo, el ratón no expresa los polipéptidos H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2, y H-2Ea). En varias realizaciones, la expresión de la primera y segunda secuencias de nucleótidos está bajo el control de los respectivos promotores de ratón y elementos reguladores endógenos. En diversas realizaciones de la invención, la primera y la segunda secuencias de nucleótidos se encuentran en el mismo cromosoma. En algunos aspectos, el ratón comprende dos copias del locus MHC II quimérico que contienen la primera y la segunda secuencias de nucleótidos, mientras que, en otros aspectos, el ratón comprende una copia del locus MHC II que contiene la primera y la segunda secuencias de nucleótidos. De este modo, el ratón puede ser homocigótico o heterocigótico para el locus MHC II quimérico que contiene la primera y la segunda secuencias de nucleótidos. En varias realizaciones, la primera y la segunda secuencias de 60 nucleótidos están comprendidas en la línea germinal del ratón.

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, se proporciona un ratón que comprende un locus MHC II quimérico en un locus MHC II endógeno de ratón, por ejemplo, mediante la sustitución de los genes H-2A y H-2E endógenos de ratón. En algunos aspectos, el locus quimérico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de un HLA-DRA humano y dominios transmembrana y citoplásmicos de una cadena α de H-2E, así como un dominio extracelular de HLA-DR β 1*04 humano y dominios transmembrana y citoplásmicos de una cadena β de H-2E. Los diversos dominios del locus quimérico están unidos de tal manera que el locus expresa un complejo MHC II quimérico de humano/ratón funcional.

En varias realizaciones, un roedor, por ejemplo, un ratón o rata que expresa una proteína del MHC II quimérica funcional procedente de un locus MHC II quimérico que se describe en la presente memoria presenta la proteína quimérica sobre una superficie celular. En una realización, el roedor expresa la proteína del MHC II quimérica sobre una superficie celular en una distribución celular que es la misma que la observada en un ser humano. En un aspecto, la célula presenta un fragmento de péptido (fragmento de antígeno) unido a una porción extracelular (por ejemplo, la porción extracelular de HLA-DR4 humana) de la proteína del MHC II quimérica.

En varias realizaciones, una célula que presenta la proteína del MHC II quimérica, por ejemplo, la proteína HLA-DR4/H-2E es una célula presentadora de antígeno (APC) por ejemplo, un macrófago, una célula dendrítica, o un linfocito B. En algunas realizaciones, el fragmento de péptido presentado por la proteína quimérica se deriva de un tumor. En otras realizaciones, el fragmento de péptido presentado por la proteína del MHC II quimérica se deriva de un patógeno, por ejemplo, una bacteria, un virus, o un parásito.

La proteína del MHC II quimérica descrita en la presente memoria puede interactuar con otras proteínas sobre la superficie de la misma célula o una segunda célula. En algunas realizaciones, la proteína del MHC II quimérica interactúa con proteínas endógenas no humanas sobre la superficie de dicha célula. La proteína del MHC II quimérica puede también interactuar con proteínas humanas o humanizadas sobre la superficie de la misma célula o una segunda célula. En algunos ejemplos, la segunda célula es un linfocito T, y la proteína del MHC II quimérica interactúa con el receptor de linfocitos T (TCR) y su correceptor CD4. En algunos ejemplos, el linfocito T es un linfocito T endógeno de ratón. En otros ejemplos, el linfocito T es un linfocito T humano. En algunos ejemplos, el TCR es un TCR humano o humanizado. En ejemplos adicionales, el CD4 es un CD4 humano o humanizado. En otro ejemplo, tanto uno como ambos TCR y CD4 no son humanos, por ejemplo, ratón o rata.

En una realización, se proporciona un roedor modificado genéticamente como se describe en la presente memoria que no desarrolla tumores a una velocidad mayor que el animal silvestre que carece de un gen MHC II quimérico. En algunas realizaciones, el animal no desarrolla neoplasias hematológicas, por ejemplo, diversos linfomas de linfocitos T y linfocitos B, leucemias, linfomas compuestos (por ejemplo, linfoma de Hodgkin), a una velocidad mayor que el animal silvestre.

Además de un roedor diseñado mediante ingeniería genética, se describe también en la presente memoria un embrión de roedor (por ejemplo, un embrión de ratón o de rata), en donde el embrión comprende una célula ES donante que se deriva de un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata como se describe en la presente memoria. En un aspecto, el embrión comprende una célula ES donante que comprende el gen MHC II quimérico, y células del embrión hospedador.

Se describe también en la presente memoria un tejido, en donde el tejido se deriva de un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata como se describe en la presente memoria, y expresa la proteína del MHC II quimérica (por ejemplo, la proteína HLA-DR4/H-2E).

Además, se describe una célula de roedor aislada de un roedor como se describe en la presente memoria. En un ejemplo, la célula es una célula ES. En un ejemplo, la célula es una célula presentadora de antígeno, por ejemplo, célula dendrítica, macrófago, linfocito B. En un ejemplo, la célula es una célula inmunitaria. En un ejemplo, la célula inmunitaria es un linfocito.

Se describe también en la presente memoria una célula de roedor que comprende un cromosoma o fragmento del mismo de un roedor como se describe en la presente memoria. En un ejemplo, la célula de roedor comprende un núcleo de un roedor como se describe en la presente memoria. En un ejemplo, la célula de roedor comprende el cromosoma o fragmento del mismo como resultado de una transferencia nuclear.

En un aspecto, se describe una célula pluripotente inducida de roedor que comprende un gen que codifica una proteína del MHC II quimérica (por ejemplo, una proteína HLA-DR4/H-2E) como se describe en la presente memoria. En un ejemplo, la célula pluripotente inducida se deriva de un roedor como se describe en la presente memoria.

En un aspecto, se proporciona un hibridoma o cuadroma, derivado de una célula de un roedor como se describe en la presente memoria. En un ejemplo, el roedor es un ratón o una rata.

En un aspecto, se describe en la presente memoria una preparación *in vitro* que comprende una primera célula que contiene una proteína superficial del MHC II quimérica de humano/roedor que comprende un péptido unido para formar un complejo MHC II/péptido quimérico de humano/roedor, y una segunda célula que se une al complejo MHC

5 II/péptido quimérico de humano/roedor. En un ejemplo, la segunda célula comprende un receptor de linfocitos T humano o humanizado, y en una realización además comprende un CD4 humano o humanizado. En un ejemplo, la segunda célula es una célula de roedor (por ejemplo, ratón o rata) que comprende un receptor de linfocitos T humano o humanizado y una proteína CD4 humana o humanizada. En un ejemplo, la segunda célula es una célula humana.

10 Se proporciona también un método para preparar un roedor modificado genéticamente, por ejemplo, un ratón o una rata descritos en la presente memoria. El método para obtener un roedor diseñado mediante ingeniería genética da como resultado un animal cuyo genoma comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína del MHC II quimérica (por ejemplo, los polipéptidos α y β del MHC II quiméricos). En una realización, el método da como resultado un ratón diseñado mediante ingeniería genética, cuyo genoma comprende, en un locus MHC II endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína del MHC II quimérica de humano/ratón, en donde una porción humana de la proteína del MHC II quimérica comprende un dominio extracelular de un HLA-DR4 humano y una porción de ratón comprende dominios transmembrana y citoplásmicos de un H-2E de ratón. En algunas realizaciones, el método utiliza una construcción directora preparada utilizando la tecnología VELOCIGENE®, introduciendo la construcción en las células ES, e introduciendo los clones de células ES dirigidas en un embrión de ratón utilizando la tecnología VELOCIMOUSE®, tal como se describe en los Ejemplos. En una realización, las células ES son una mezcla de cepas 129 y C57BL/6 de ratón; en una realización, las células ES son una mezcla de cepas BALB/c y 129 de ratón.

20 Se describe también una construcción de nucleótidos utilizada para generar los roedores diseñados mediante ingeniería genética descritos en la presente memoria; en un aspecto, la construcción de nucleótidos comprende: brazos de homología 5' y 3' no humanos, un fragmento de ADN que comprende las secuencias de la cadena α y β de HLA-DR, y un casete de selección flanqueado por sitios de recombinación. En un ejemplo, las secuencias de la cadena α y β de HLA-DR humana son secuencias genómicas que comprenden intrones y exones de los genes de la cadena α y β de HLA-DR humana. En un ejemplo, los brazos de homología no humanos son homólogos de la secuencia genómica del MHC II no humano.

30 En un ejemplo, la secuencia de la cadena α de HLA-DR humana comprende una secuencia de codificación del dominio $\alpha 1$ y $\alpha 2$. En un ejemplo específico, comprende, de 5' a 3': exón $\alpha 1$ (exón 2), intrón $\alpha 1/\alpha 2$ (intrón 2), y exón $\alpha 2$ (exón 3). En un ejemplo, la secuencia de la cadena β de HLA-DR humana comprende la secuencia de codificación del dominio $\beta 1$ y $\beta 2$. En un ejemplo específico, comprende, de 5' a 3': exón $\beta 1$ (exón 2), intrón $\beta 1/\beta 2$ (intrón 2), y exón $\beta 2$ (exón 3).

35 Un casete de selección es una secuencia de nucleótidos insertada en una construcción directora para facilitar la selección de las células (por ejemplo, células ES) que han integrado la construcción de interés. Se conocen en la técnica numerosos casetes de selección adecuados. Normalmente, un casete de selección permite la selección positiva en presencia de un antibiótico concreto (por ejemplo, Neo, Hyg, Pur, CM, SPEC, etc.). Además, un casete de selección puede estar flanqueado por sitios de recombinación, que permiten la delección del casete de selección tras el tratamiento con enzimas recombinasa. Los sitios de recombinación normalmente utilizados son *loxP* y *Frt*, reconocidos por las enzimas Cre y Flp, respectivamente, pero se conocen otros en la técnica. Un casete de selección puede localizarse en cualquier parte en la construcción fuera de la región de codificación. En un ejemplo, el casete de selección se localiza en el intrón de la cadena β , por ejemplo, intrón del dominio $\beta 2$ /transmembrana (intrón 3).

45 En un ejemplo, los brazos de homología de 5' y 3' comprenden la secuencia genómica en las localizaciones 5' y 3' del locus MHC II endógeno no humano. En un ejemplo, el brazo de homología 5' comprende la secuencia genómica en la dirección 5' del gen H-2Ab1 de ratón y el brazo de homología 3' comprende la secuencia genómica en la dirección 3' del gen H-2Ea de ratón. En este ejemplo, la construcción permite la sustitución de los genes H-2E y H-2A de ratón.

50 De este modo, en un aspecto, se describe en la presente memoria una construcción de nucleótidos que comprende, de 5' a 3': un brazo de homología 5' que contiene la secuencia genómica de ratón en la dirección 5' del gen H-2Ab1 de ratón, una primera secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia que codifica una cadena β del MHC II quimérica de humano/ratón, una segunda secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia que codifica una cadena α del MHC II quimérica de humano/ratón, y un brazo de homología 3' que contiene la secuencia genómica de ratón en la dirección 3' del gen H-2Ea. En un ejemplo específico, la primera secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia que codifica una cadena β del MHC II quimérica de humano/ratón comprende el exón $\beta 1$ humano, el intrón $\beta 1/\beta 2$, el exón $\beta 2$, un casete de selección flanqueado por los sitios de recombinación insertado en la región intrónica entre la secuencia del exón $\beta 2$ humano y la secuencia de un exón del dominio transmembrana de ratón. En un ejemplo específico, la segunda secuencia de nucleótidos que comprende una cadena α del MHC II quimérica de humano/ratón comprende el exón $\alpha 1$ humano, el intrón $\alpha 1/\alpha 2$, y un exón $\alpha 2$ humano. Se representa una construcción ilustrativa en la Fig. 5 (MAID 1680).

65 Tras completar el direccionamiento del gen, las células ES o los roedores modificados genéticamente se criban para confirmar la incorporación correcta de la secuencia de nucleótidos exógena de interés o la expresión del polipéptido exógeno. Los expertos en la materia conocen numerosas técnicas que incluyen (aunque no de forma limitativa) la transferencia Southern, la PCR larga, la PCT cuantitativa (por ejemplo, la PCR en tiempo real usando

TAQMAN®), la hibridación mediante fluorescencia *in situ*, la transferencia Northern, citometría de flujo, análisis por transferencia de Western, inmunohistoquímica, inmunohistoquímica, etc. En un ejemplo, los roedores (por ejemplo, ratones) que contienen la modificación genética de interés pueden identificarse mediante selección para la pérdida de alelos del ratón y/o la ganancia de alelos humanos utilizando una modificación del ensayo de alelos descrito en Valenzuela y col. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659. Los expertos en la materia conocen otros ensayos que identifican un nucleótido o secuencia de aminoácidos específicos en los animales modificados genéticamente.

La descripción proporciona también un método para modificar un locus MHC II de un roedor que expresa un complejo MHC II quimérico de humano/roedor descrito en la presente memoria. En una realización, la invención proporciona un método para modificar un locus MHC II de un ratón para expresar un complejo MHC II quimérico de humano/ratón que comprende sustituir, en el locus MHC II endógeno de ratón, una secuencia de nucleótidos que codifica un complejo MHC II de ratón por una secuencia de nucleótidos que codifica un complejo MHC II quimérico de humano/ratón. En un aspecto específico, la secuencia de nucleótidos que codifica el complejo MHC II quimérico de humano/ratón comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de una cadena α del MHC II humano (por ejemplo, la cadena α de HLA-DR4) y los dominios transmembrana y citoplásmicos de una cadena α del MHC II de ratón (por ejemplo, la cadena α de H-2E) y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de una cadena β del MHC II humano (por ejemplo, la cadena β de HLA-DR4) y los dominios transmembrana y citoplásmicos de la cadena β del MHC II de ratón (por ejemplo, la cadena β de H-2E, por ejemplo, la cadena H-2Eb1). En algunas realizaciones, el locus MHC II modificado de ratón expresa una proteína HLA-DR4/H-2E.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un método para preparar una molécula quimérica de HLA de clase II humana/MHC de clase II de roedor que comprende expresar en una única célula una proteína HLA-DR4/H-2E quimérica a partir de una construcción de nucleótido como se describe en la presente memoria. En un ejemplo, la construcción de nucleótido es un vector vírico; en un ejemplo específico, el vector vírico es un vector lentivírico. En un ejemplo, la célula se selecciona entre una célula CHO, COS, 293, HeLa, y una célula retinal que expresa una secuencia de ácido nucleico vírico (por ejemplo, una célula PERC.6™).

En un aspecto, se describe en la presente memoria una célula que expresa una proteína HLA-DR4/H-2E quimérica. En un ejemplo, la célula comprende un vector de expresión que comprende una secuencia de MHC de clase II como se describe en la presente memoria. En un ejemplo, la célula se selecciona entre CHO, COS, 293, HeLa, y una célula retinal que expresa una secuencia de ácido nucleico vírico (por ejemplo, una célula PERC.6™).

Se describe también en la presente memoria una molécula MHC de clase II quimérica como se describe en la presente memoria en donde la molécula MHC de clase II quimérica comprende los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, y $\beta 2$ de una proteína del MHC II humana, por ejemplo, la proteína HLA-DR4, y los dominios transmembrana y citoplásmicos de una proteína del MHC II de roedor, por ejemplo, la proteína H-2E de ratón. El complejo MHC II quimérico que comprende un dominio extracelular de HLA-DR4 descrito en la presente memoria puede detectarse mediante anticuerpos dirigidos contra HLA-DR. De este modo, una célula que expresa un polipéptido MHC II quimérico de humano/roedor puede detectarse y/o seleccionarse utilizando un anticuerpo dirigido contra HLA-DR.

Aunque los ejemplos siguientes describen un animal diseñado mediante ingeniería genética cuyo genoma comprende una sustitución de una secuencia de nucleótidos que codifica las proteínas H-2A y H-2E de ratón por una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína HLA-DR4/H-2E de humano/ratón, el experto en la técnica entendería que se puede usar una estrategia similar para introducir quimeras que comprenden otros genes MHC II humanos (HLA-DP y HLA-DQ). De este modo, una realización adicional de la invención se dirige a un animal diseñado mediante ingeniería genética cuyo genoma comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína HLA-DQ/H-2A quimérica. En una realización, la secuencia de nucleótidos codifica una proteína HLA-DQ2.5/H-2A quimérica. En otra realización, la secuencia de nucleótidos codifica una proteína HLA-DQ8/H-2A quimérica. Además, se contempla también la introducción de múltiples moléculas del MHC II humanizadas (por ejemplo, HLA-DR/H-2E y HLA-DQ/H-2A quiméricas).

Uso de animales modificados genéticamente

Los roedores modificados genéticamente descritos en la presente memoria producen las APC con MHC II humano o humanizado sobre la superficie celular y, como resultado, presentan péptidos derivados de proteínas citosólicas como epítopos para linfocitos T de una manera análoga a la humana, ya que, prácticamente, todos los componentes del complejo son humanos o humanizados. Los roedores modificados genéticamente de la invención se pueden usar para estudiar la función del sistema inmunitario humano en el animal humanizado; para la identificación de antígenos y epítopos de antígenos que estimulan la respuesta inmunitaria (por ejemplo, epítopos de linfocitos T, por ejemplo, epítopos únicos de cáncer humano), por ejemplo, para usar en el desarrollo de vacunas; para evaluar candidatos de vacunas y otras estrategias de vacunas; para estudiar la autoinmunidad humana; para estudiar las enfermedades infecciosas humanas; y de otra forma, para idear mejores estrategias terapéuticas basadas en la expresión del MHC humano.

5 El complejo MHC II se une a péptidos derivados de proteínas extracelulares, por ejemplo, bacterias extracelulares, células vecinas, o polipéptidos unidos mediante receptores de linfocitos B e internalizados en un linfocito B. Una vez que las proteínas extracelulares penetran en la ruta endocítica, se degradan formando péptidos, y los péptidos se unen y se presentan mediante el MHC II. Una vez que un péptido presentado por el MHC II es reconocido por los linfocitos T CD4+, los linfocitos T se activan, proliferan, se diferencian en diversos subtipos de linfocitos T auxiliares (por ejemplo, T_{H1}, T_{H2}), y conducen a numerosos eventos, incluyendo la activación de la destrucción de patógenos mediada por macrófagos, proliferación de linfocitos B, y producción de anticuerpos. Debido al papel del MHC II en la respuesta inmunitaria, la comprensión de la presentación de péptidos del MHC II es importante en el desarrollo de tratamientos para patologías humanas. Sin embargo, la presentación de antígenos en el contexto de un MHC II de ratón es poco relevante para la enfermedad humana, ya que los complejos MHC de humano y ratón reconocen los antígenos de forma diferente, por ejemplo, un MHC II de ratón puede no reconocer los mismos antígenos o puede presentar diferentes epítomos que un MHC II humano. De este modo, los datos más relevantes de las patologías humanas se obtuvieron a través del estudio de la presentación de epítomos antigénico por el MHC humano.

15 De este modo, los animales diseñados mediante ingeniería genética de la presente invención son útiles, entre otras cosas, para evaluar la capacidad de un antígeno para iniciar una respuesta inmunitaria en un ser humano, y para generar una diversidad de antígenos e identificar un antígeno específico que se pueda usar en el desarrollo de vacunas humanas.

20 En un aspecto, se describe en la presente memoria un método para determinar la antigenicidad en un ser humano de una secuencia peptídica que comprende exponer un roedor modificado genéticamente como se describe en la presente memoria a una molécula que comprende la secuencia peptídica, permitiendo al animal roedor desencadenar una respuesta inmunitaria, y detectar en el roedor una célula que se une a una secuencia del péptido presentada por un complejo MHC II humanizado descrito en la presente memoria.

25 En un aspecto, se describe en la presente memoria un método para determinar si un péptido provocará una respuesta inmunitaria en un ser humano, que comprende exponer un roedor modificado genéticamente como se describe en la presente memoria al péptido, permitir al roedor desencadenar una respuesta inmunitaria, y detectar en el roedor una célula que se une a una secuencia del péptido mediante una molécula MHC de clase II quimérica humana/no humana como se describe en la presente memoria. En un ejemplo, el animal no humano, tras la exposición, comprende un linfocito T CD4+ restringido a MHC de clase II que se une al péptido.

30 En un aspecto, se describe en la presente memoria un método para identificar un epítomo de linfocito T CD4+ humano, que comprende exponer un roedor como se describe en la presente memoria a un antígeno que comprende un punto epítomo de linfocitos T, permitir al roedor desencadenar una respuesta inmunitaria, e identificar el epítomo unido mediante el linfocito T CD4+ restringido a MHC de clase II.

35 En un aspecto, se describe un método en la presente memoria para identificar un antígeno que genera una respuesta de linfocitos T CD4+ en un ser humano, que comprende exponer un presunto antígeno a un ratón como se describe en la presente memoria, permitir al ratón generar una respuesta inmunitaria, detectar una respuesta de linfocitos T CD4+ que sea específica del antígeno en el contexto de una molécula MHC II humana (por ejemplo, una molécula HLA-DR), e identificar el antígeno unido por la molécula restringida a MHC II humano (por ejemplo, la molécula restringida a HLA-DR humana).

40 En un ejemplo, el antígeno comprende una proteína bacteriana. En un ejemplo, el antígeno comprende un antígeno de célula tumoral humana. En un ejemplo, el antígeno comprende una presunta vacuna para usar en un ser humano, u otro producto biofarmacéutico. En un ejemplo, el antígeno comprende un epítomo humano que genera anticuerpos en un ser humano. En otro ejemplo más, un antígeno comprende un antígeno de célula de levadura o fúngica. En otro ejemplo más, un antígeno se deriva de un parásito humano.

45 En un aspecto, se describe en la presente memoria un método para determinar si un presunto antígeno contiene un epítomo que, tras su exposición a un sistema inmunitario humano, generará una respuesta inmunitaria restringida a HLA-DR (por ejemplo, una respuesta restringida a HLA-DR4), que comprende exponer un ratón como se describe en el presente documento al presunto antígeno y medir una respuesta inmunitaria restringida a HLA-DR (por ejemplo, restringida a HLA-DR4) en el ratón. En otro aspecto, se describe en la presente memoria un método para determinar si un presunto antígeno contiene un epítomo que, tras la exposición a un sistema inmunitario humano, generará una respuesta inmunitaria restringida a HLA-DQ.

50 Se describe también en la presente memoria un método para generar anticuerpos contra un antígeno, por ejemplo, un antígeno derivado de bacteria, parásito, etc., presentado en el contexto de un complejo MHC II humano, que comprende exponer un ratón descrito en la presente memoria a un antígeno, permitir al ratón desencadenar una respuesta inmunitaria, en donde la respuesta inmunitaria comprende la producción de anticuerpos, y aislar un anticuerpo que reconoce el antígeno presentado en el contexto del complejo MHC II humano. En un ejemplo, para generar anticuerpos para el péptido-MHC II, el MHC II humanizado de ratón se inmuniza con un péptido inmunógeno del MHC II.

- 5 En un aspecto, se describe en la presente memoria un método para identificar un dominio variable de un receptor de linfocitos T que reconoce un antígeno presentado en el contexto del MHC II (por ejemplo, un antígeno tumoral humano, una vacuna, etc.) que comprende exponer un ratón que comprende un complejo MHC II humanizado descrito en la presente memoria al antígeno, permitir al ratón generar una respuesta inmunitaria, y aislar del ratón una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio variable de un receptor de linfocitos T que se une al antígeno restringido a MHC II. En un ejemplo, el antígeno se presenta en el contexto de un MHC II humanizado (por ejemplo, ectodominio de HLA II humano/dominio transmembrana y/o citoplásmico del MHC II de ratón).
- 10 La consecuencia de la interacción entre un linfocito T y una APC que expresa un péptido en el contexto del MHC II (por ejemplo, ectodominio de HLA II humano/dominio transmembrana y/o citoplásmico del MHC II de ratón) puede medirse mediante numerosas técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, ensayos de proliferación de linfocitos T, ensayos de liberación de citoquinas, etc.
- 15 Además de la capacidad de identificar antígenos y sus epítopos de linfocitos T procedentes de patógenos o neoplasmas, los animales modificados genéticamente de la invención se pueden usar para identificar autoantígenos de relevancia en una enfermedad autoinmunitaria humana, y estudiar de otra forma la progresión de la enfermedad autoinmunitaria humana. Se sabe que los polimorfismos en los loci de HLA juegan un papel en la predisposición a la enfermedad autoinmunitaria. De hecho, se han identificado polimorfismos específicos en los loci HLA-DR y HLA-DQ
- 20 que se correlacionan con el desarrollo de la artritis reumatoide, diabetes de tipo I, tiroiditis de Hashimoto, esclerosis múltiple, miastenia grave, enfermedad de Grave, lupus sistémico eritematoso, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, y otras enfermedades autoinmunitarias. Ver, por ejemplo, Wong y Wen (2004) What can the HLA transgenic mouse tell us about autoimmune diabetes?, *Diabetologia* 47:1476-87; Taneja y David (1998) HLA Transgenic Mice as Humanized Mouse Models of Disease and Immunity, *J. Clin. Invest.* 101:921-26; Bakker y col. (2006), anteriormente citado; y el International MHC and Autoimmunity Genetics Network (2009) Mapping of multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:18680-85.
- 25 De este modo, los métodos para obtener animales con un complejo MHC II humanizado descritos en la presente memoria se pueden usar para introducir moléculas del MHC II que se piensa están asociadas con enfermedades autoinmunitarias humanas específicas, y se puede estudiar la progresión de la enfermedad autoinmunitaria humana. Además, los roedores descritos en la presente memoria se pueden usar para desarrollar modelos animales de la enfermedad autoinmunitaria humana. Los ratones según la invención que transportan las proteínas MHC II humanizadas descritas en la presente memoria se pueden usar para identificar autoantígenos potenciales, para cartografiar los epítopos implicados en la
- 30 progresión de la enfermedad, y para diseñar estrategias para la modulación de la enfermedad autoinmunitaria.
- 35 Además, los animales modificados genéticamente descritos en la presente memoria se pueden usar en el estudio de la respuesta alérgica humana. Como las respuestas alérgicas parecen estar asociadas con los alelos MHC II, los animales modificados genéticamente descritos en la presente memoria se pueden usar para determinar la restricción de HLA de la respuesta de los linfocitos T específica de alérgeno y desarrollar estrategias para combatir la respuesta alérgica.

Ejemplos

- 45 La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos. Se exponen estos ejemplos para ayudar en la comprensión de la invención, aunque no se pretende, ni se debe considerar, que limiten su alcance en ningún modo. Los Ejemplos no incluyen descripciones detalladas de los métodos convencionales que conocerán bien los expertos en la técnica (técnicas de clonación molecular, etc.). Salvo que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es un peso molecular promedio, la temperatura se indica en grados Celsius, y la presión es la atmosférica, o un valor cercano a esta.

Ejemplo 1. Deleción de los loci II H-2A y H-2E de MHC de clase II endógenos

- 55 Se preparó el vector director para introducir una deleción de los genes H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2, y H-2Ea de MHC de clase II endógenos utilizando la tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE® (ver, *por ejemplo*, patente US- 6.586.251 y Valenzuela y col., *anteriormente citado*). Se modificó el ADN del cromosoma artificial bacteriano (BAC) RP23-458i22 (Invitrogen) para eliminar los genes MHC de clase II endógenos H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2, y H-2Ea.
- 60 En resumen, los brazos de homología en la dirección 5' y en la dirección 3' se derivaron mediante la PCR del ADN del BAC de ratón a partir de las localizaciones 5' del gen H-2Ab1 y 3' del gen H-2Ea, respectivamente. Como se representa gráficamente en la Fig. 5, estos brazos de homología se utilizaron para preparar un casete que eliminaba ~79 kb de RP23-458i22 que comprendía los genes H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2, y H-2Ea del locus MHC de clase II mediante recombinación homóloga bacteriana (BHR). Esta región se sustituyó por un casete de higromicina
- 65 flanqueado por los sitios lox66 y lox71. El vector director final desde 5' a 3' incluyó un brazo de homología de 34 kb que comprende la secuencia 5' genómica de ratón en el gen H-2Ab1 del locus MHC de clase II endógeno, un sitio 5'

lox66, un casete de higromicina, un sitio 3' lox71 y un brazo de homología de 63 kb que comprende la secuencia 3' genómica de ratón en el gen H-2Ea del locus MHC de clase II endógeno (MAID 5111, ver la Fig. 5).

Se usó el vector director del ADN del BAC (descrito anteriormente) para electroporar las células ES de ratón para crear células ES modificadas que comprenden una delección del locus MHC de clase II endógeno. Las células ES positivas que contenían un locus MHC de clase II endógeno eliminado se identificaron mediante el ensayo de la PCR cuantitativa usando sondas TAQMAN™ (Lie y Petropoulos (1998) Curr. Opin. Biotechnology 9:43-48). La región en la dirección 5' del locus eliminado se confirmó mediante la PCR utilizando los cebadores 5111U F (CAGAACGCCAGGCTGTAAC; Id. de sec. n.º1) y 5111U R (GGAGAGCAGGGTCAGTCAAC; Id. de sec. n.º2) y la sonda 5111U P (CACCGCCACTCACAGCTCCTTACA; Id. de sec. n.º3), mientras que la región en la dirección 3' del locus detectado se confirmó utilizando los cebadores 5111D F (GTGGGCACCATCTTCATCATT; Id. de sec. n.º4) y 5111D R (CTTCCTTTCCAGGGTGTGACTC; Id. de sec. n.º5) y la sonda 5111D P (AGGCCTGCGATCAGGTGGCACCT; Id. de sec. n.º6). Se confirmó la presencia del casete de higromicina procedente del vector director utilizando los cebadores HYGF (TGCGGCCGATCTTAGCC; Id. de sec. n.º7) y HYGR (TTGACCGATTCTTGCGG; Id. de sec. n.º8) y la sonda HYGP (ACGAGCGGGTTCGGCCATTC; Id. de sec. n.º9). La secuencia de nucleótidos a través del punto de delección en 5' (Id. de sec. n.º10) incluyó lo siguiente, que indica la secuencia endógena de ratón en la dirección 5' del punto de delección (contenida en los paréntesis siguientes) unida de forma contigua a la secuencia del casete presente en el punto de delección: (TTTGTAACA AAGTCTACCC AGAGACAGAT GACAGACTTC AGCTCCAATG CTGATTGGTT CCTCACTTGG GACCAACCCT) CTCGAGTACC GTTCGTATAA TGTATGCTAT ACGAAGTTAT ATGCATCCGG GTAGGGGAGG. La secuencia de nucleótidos a través del punto de delección en la dirección 3' (Id. de sec. n.º11) incluyó lo siguiente, que indica la secuencia del casete contigua de la secuencia endógena de ratón en la dirección 3' del punto de delección (contenida en los paréntesis siguientes): CCTCGACCTG CAGCCCTAGG ATAACCTCGT ATAATGTATG CTATACGAAC GGTAGAGCTC (CACAGGCATT TGGGTGGGCA GGGATGGACG GTGACTGGGA CAATCGGGAT GGAAGAGCAT AGAATGGGAG TTAGGGAAGA). Los clones de células ES positivos se utilizaron a continuación para implantar ratones hembras utilizando el método VELOCIMOUSE® (descrito a continuación) para generar una camada de crías que contenían una delección del locus MHC de clase II endógeno.

Las células ES diana anteriormente descritas se utilizaron como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en la fase de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (ver, por ejemplo, patente US-7.294.754 y Poueymirou y col. (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor genotyped ES cells allowing immediate phenotypic analyses, Nature Biotech. 25(1):91-99). Se identificaron ratones que contenían una delección en los genes H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2, y H-2Ea en el locus MHC de clase II endógeno mediante genotipación usando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela y col., citado anteriormente) que detectó la presencia del casete de higromicina y confirmó la ausencia de las secuencias del MHC de clase II endógeno.

Ratones que contenían una delección en los genes H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2, y H-2Ea en el locus MHC de clase II endógeno se pueden reproducir para criar una cepa de ratón eliminadora de Cre (ver, por ejemplo, publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2009/114400) a fin de eliminar cualquier casete de higromicina de tipo lox introducido por el vector director que no se elimina, por ejemplo, en la fase de célula ES o en el embrión. Opcionalmente, el casete de higromicina queda retenido en los ratones.

Ejemplo 2. Generación de vectores directores grandes (LTVEC) que comprenden genes H-2Eb1 y H-2Ea humanizados

Se diseñó un vector director para introducir secuencias de MHC II humanizadas como se representa gráficamente en la Fig. 4. Utilizando la tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE®, se modificó el ADN del cromosoma artificial bacteriano (BAC) RP23-458i22 en diversos pasos para: (1) crear un vector que comprende un exón 1 de I-E α funcional a partir del gen BALB/c H-2Ea (Fig. 4A); (2) crear un vector que comprende la sustitución de los exones 2 y 3 del gen I-E β de ratón con los de DR β 1*04 de humano y la sustitución de los exones 2 y 3 de I-E α de ratón con los de DR α 1*01 humano (Figs. 4B); (3) crear un vector que transporta los exones 2 y 3 de DR α 1*04 humano entre los restantes exones I-E β de ratón, y los exones 2 y 3 de DR β 1*01 humano entre los restantes exones I-E α de ratón incluyendo un exón 1 de I-E α funcional de ratón BALB/c (paso (1) (Fig. 4C); y (4) eliminar un sitio de corte y empalme crítico en el vector generado en (3) (Fig. 4D).

Específicamente, puesto que en los ratones C57Bl/6 el gen I-E α es un pseudogén debido a la presencia de un exón 1 no funcional, en primer lugar, se creó un vector que comprendía un exón 1 de I-E α funcional a partir del gen H-2Ea de BALB/c (Fig. 4A). Se modificó el BAC RP23-458i22 mediante recombinación homóloga bacteriana (1.BHR) para sustituir el gen de resistencia al cloranfenicol por el de la espectromicina. El vector resultante se modificó adicionalmente mediante BHR para sustituir la región de codificación de I-A e I-E completa por un casete de neomicina flanqueado por sitios de recombinación (2.BHR). Otro ciclo de BHR (3. BHR) con la construcción que comprende un exón que codifica la secuencia líder de I-E α (exón 1) de BALB/c y el gen del cloranfenicol flanqueado por los sitios de restricción PI-SceI e I-CeuI dio como resultado un vector que comprendía el exón 1 de H-2Ea de BALB/c funcional.

De manera independiente, para generar un vector que comprendía la sustitución de los exones 2 y 3 del gen I-E β de ratón por los del DR β 1*04 humano y la sustitución de los exones 2 y 3 de I-E α de ratón por los de DR α 1*01 humano,

se modificó el BAC de RP23-458i22 mediante diversas etapas de recombinación homóloga, 4. BHR - 8. BHR (Fig. 4B). La secuencia de ácido nucleico resultante estaba flanqueada por los sitios de restricción PI-SceI/I-CeuI para permitir la ligadura en la construcción que transporta el exón 1 de I-E α de BALB/c, mencionado anteriormente (Fig. 4C).

5 La secuencia de la construcción final representada gráficamente en la Fig. 4C contenía un sitio de corte y empalme críptico en el extremo 3' del intrón de BALB/c. Se llevaron a cabo diversas etapas de BHR (11. BHR – 12. BHR) seguidas por una etapa de delección para obtener el vector director final (MAID 1680) que se utilizó para su electoporación en células ES (Fig. 4D).

10 De forma detallada, el vector director final (MAID 1680), de 5' a 3', estaba comprendido por un brazo de homología 5' consistente en una secuencia genómica de ratón de ~26 kb que finaliza exactamente en la dirección 5' del gen H-2Ab1 del locus MHC de clase II endógeno; una inserción de ~59 kb que contenía el gen de la cadena β de MHC II humanizado (gen H-2Eb1 humanizado) y el gen de la cadena α de MHC II humanizado (gen H-2Ea humanizado) y un casete de neomicina de tipo flox; y un brazo de homología 3' de ratón consistente en una secuencia genómica de ratón de ~57 kb que comienza exactamente en la dirección 3' del gen H-2Ea del locus MHC de clase II endógeno. La secuencia de nucleótidos a través de la unión entre el brazo 5' y la inserción (Id. de sec. n.º12) incluía lo siguiente: (TGCTGATTGG TTCCTCACTT GGGACCAACC C) TAAGCTTTATCTATGTCGGGTGCGGAGAAAGAGGTAATGAAATGGCACA AGGAGATCAC ACACCCAAAC CAAACTCGCC, donde la secuencia en cursiva es un único sitio PI-SceI, y la secuencia genómica de ratón en el brazo de homología 5' está en paréntesis. La secuencia de nucleótidos a través de la unión entre la inserción y el brazo 3' (Id. de sec. n.º13) incluía lo siguiente: CACATCAGTG AGGCTAGAAT AAATTTAAAAT CGCTAATATG AAAATGGGG (ATTTGTACCT CTGAGTGTGA AGGCTGGGAA GACTGCTTTC AAGGGAC), donde la secuencia genómica de ratón en el brazo de homología 3' está en paréntesis.

25 En la inserción de ~59 kb, el gen H-2Eb1 estaba modificado como sigue: una región de 5136 pb de H-2Eb1, incluyendo los últimos 153 pb del intrón 1, el exón 2, el intrón 2, el exón 3, y los primeros 122 pb del intrón 3, se sustituyeron con los 3111 pb de la región homóloga del HLA-DRB1*04 humano, incluyendo los últimos 148 pb del intrón 1, el exón 2, el intrón 2, el exón 3, y los primeros 132 pb del intrón 3. En la unión entre las secuencias de ser humano y ratón del intrón 3, se insertó un casete que consistía en un sitio 5' lox2372, el promotor UbC, el gen de resistencia a la neomicina, y un sitio 3' lox2372. El gen resultante codificó una proteína HLA-DRB1*04/H-2Eb1 quimérica que comprende la secuencia líder de H-2Eb1 de ratón, los dominios β 1 y β 2 humanos de DRB1*04, y el dominio transmembrana y la cola citoplásmica de ratón. La secuencia de nucleótidos a través de la unión de ratón/humano en el intrón 1 (Id. de sec. n.º14) incluía lo siguiente: (TCCATCACTT CACTGGGTAG CACAGCTGTA ACTGTCCAGC CTG) GGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTGATCGAGCTCCCTG GGCTGCAGGT GGTGGGCGTT GCGGGTGGGG CCGGTTAA, donde la secuencia en cursiva es un sitio de clonación múltiple introducido durante las etapas de clonación, y las secuencias del intrón 1 de ratón están en paréntesis. La secuencia de nucleótidos a través de la unión entre el intrón 3 y el casete de neomicina (Id. de sec. n.º15) incluía lo siguiente: (ATCTCCATCA GAAGGGCAC C GGT) ATAACCTTCGTATAAGGTATCCTATACGAAGTTATATG CATGGCCTCC GCGCCGGGTT, donde el sitio 5' lox2372 está en cursiva, y la secuencia del intrón 3 humano está en paréntesis. La secuencia de nucleótidos a través de la unión entre el casete de neomicina y el intrón 3 de ratón (Id. de sec. n.º16) incluía lo siguiente: ATAACCTTCGTATAAGGTATCCTATACGAAGTTATCTCGAG (TGGCTTACAG GTAGGTGCGT GAAGCTTCTA CAAGCACAGT TGCCCCCTGG), donde el sitio 3' lox2372 está en cursiva, y la secuencia del intrón 3 de ratón está entre paréntesis.

También comprendido en la inserción de ~59 kb, el gen H-2Ea estaba modificado como sigue: una región de 1185 pb de H-2Ea, incluyendo los últimos 101 pb del intrón 1, el exón 2, el intrón 2, el exón 3, y los primeros 66 pb del intrón 3, se sustituyeron con los 1189 pb de la región homóloga del HLA-DRA1*01 humano, incluyendo los últimos 104 pb del intrón 1, el exón 2, el intrón 2, el exón 3, y los primeros 66 pb del intrón 3. Como se ha descrito anteriormente, como el exón 1 del alelo C57BL/6 de H-2Ea contiene una delección que vuelve el gen no funcional, el exón 1 de H-2Ea y el resto del intrón 1 se sustituyeron por la región equivalente de 2616 pb del alelo BALB/c de H-2Ea, que es funcional. El gen resultante codificó una proteína H-2Ea/HLA-DRA1*01 que comprende la secuencia líder de H-2Ea del ratón BALB/c, los dominios α 1 y α 2 humanos de DRA1*01, y el dominio transmembrana y la cola citoplásmica de ratón. La secuencia de nucleótidos a través de la unión de ratón/humano en el intrón 1 (Id. de sec. n.º17) incluía lo siguiente: (CTGTTTCTTC CCTAACTCCC ATTCTATGCT CTTCCATCCC GA) CCGCGGCCCA ATCTCTCTCC ACTACTTCCT GCCTACATGT ATGTAGGT, donde la secuencia en cursiva es un sitio de la enzima de restricción introducido durante las etapas de clonación, y las secuencias del intrón 1 de BALB/c están en paréntesis. La secuencia de nucleótidos a través de la unión de humano/ratón en el intrón 3 (Id. de sec. n.º18) incluía lo siguiente: CAAGGTTTCC TCCTATGATG CTTGTGTGAA ACTCGGGGCCGGCC (AGCATTAAAC AGTACAGGGA TGGGAGCACA GCTCAC), donde la secuencia en cursiva es un sitio de la enzima de restricción introducido durante las etapas de clonación, y las secuencias del intrón 3 de ratón están en paréntesis. La secuencia de nucleótidos a través de la unión de C57BL/6-BALB/c en 5' del exón 1 (Id. de sec. n.º19) incluía lo siguiente: (GAAAGCAGTC TTCCCAGCCT TCACACTCAG AGGTACAAAT) CCCCATTTTC ATATTAGCGA TTTTAATTTA TTCTAGCCTC, donde las secuencias específicas de C57BL/6 están entre paréntesis. La secuencia de nucleótidos a través de la unión BALB/c-C57BL/6 en 3' del

exón 1 (Id. de sec. n.º20) incluía lo siguiente: TCTTCCCTAA CTCCCATTCT ATGCTCTTCC ATCCCGA CCGCGG (CCCAATC TCTCTCCACT ACTTCCTGCC TACATGTATG), donde el sitio de restricción SacII está en cursiva, y las secuencias C57BL/6 están en paréntesis.

5 Ejemplo 3. Generación de ratones MHC II humanizados

Se presentan en las Figs. 5 y 8 diagramas simplificados de la estrategia para generar ratones MHC II humanizados utilizando el vector del Ejemplo 2.

10 Específicamente, se utilizó el ADN del BAC MAID1680 (descrito anteriormente) para electroporar células ES MAID5111 para crear células ES modificadas que comprenden una sustitución de los loci I-A e I-E endógenos de ratón con un fragmento genómico que comprende un locus quimérico de DR4 humano/I-E de ratón. Las células ES positivas que contienen los loci I-A e I-E endógenos eliminados sustituidos por un fragmento genómico que
15 comprende un locus quimérico de DR4 humano/IE de ratón se identificaron mediante un ensayo de la PCR cuantitativa usando las sondas TAQMAN™ (Lie y Petropoulos, *anteriormente citado*). Se confirmó la inserción de secuencias DR α humanas mediante la PCR usando los cebadores hDRA1F (CTGGCGGCTTGAAGAATTTGG; Id. de sec. n.º21), hDRA1R (CATGATTTCCAGGTTGGCTTTGTC; Id. de sec. n.º22), y la sonda hDRA1P (CGATTTGCCAGCTTTGAGGCTCAAGG; Id. de sec. n.º23). Se confirmó la inserción de secuencias DR β humanas mediante la PCR usando los cebadores hDRB1F (AGGCTTGGGTGCTCCACTTG; Id. de sec. n.º24), hDRB1R (GACCCTGGTGATGCTGAAAC; Id. de sec. n.º25), y la sonda hDRB1P (CAGGTGTAACCTCTCCACTCCGAGGA; Id. de sec. n.º26). Se confirmó la pérdida del casete de higromicina del vector director con los cebadores HYGF (TGCGCCGATCTTAGCC; Id. de sec. n.º7) y HYGR (TTGACCGATTCTTGCGG; Id. de sec. n.º8) y la sonda HYPG (ACGAGCGGGTTCGGCCCATTC; Id. de sec. n.º9).

25 A continuación se utilizaron los clones ES positivos para implantar ratones hembras utilizando el método VELOCIMOUSE® (*anteriormente citado*) para generar una camada de crías que contenía una sustitución de los loci I-A e I-E endógenos con un locus de DR4 humano/I-E de ratón. Las células ES diana anteriormente descritas se utilizaron como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en la fase de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE®. Se identificaron los ratones que contenían un locus de DR4 humano/I-E de ratón mediante genotipación utilizando un ensayo de alelos (Valenzuela y col., *citado anteriormente*) que detectó la presencia de un locus de DR4 humano/I-E de ratón.

35 Los ratones que contienen un locus de DR4 humano/I-E de ratón se pueden reproducir para crear una cepa de ratón eliminadora de Cre (ver, por ejemplo, Publicación de solicitud de patente internacional n.ºWO 20 09/114400) a fin de eliminar cualquier casete de neomicina de tipo *lox* introducido por el vector director que no se haya eliminado, por ejemplo, en la fase de célula ES o en el embrión (ver la Fig. 6).

40 Ejemplo 4. Expresión de HLA-DR4 quimérica en ratones modificados genéticamente

Se perfundieron los bazos de ratones silvestres o HLA-DR4 heterocigóticos humanizados ("1681 HET") con Colagenasa D (Roche Bioscience) y se lisaron los eritrocitos con tampón de lisis ACK. Los esplenocitos se cultivaron durante dos días con 25 microgramos/ml de poli(LC) para estimular la expresión de los genes MHC-II. Se analizó la expresión superficial celular de HLA-DR4 humano mediante FACS utilizando el anticuerpo dirigido
45 contra CD3 (17A2), anticuerpo dirigido contra CD19 (1D3), anticuerpo dirigido contra CD11c (N418), anticuerpo dirigido contra F480 (BM8), anticuerpo dirigido contra I-A/I-E (M15) y anticuerpo dirigido contra HLADR (L243) conjugados con fluorocromo. Se llevó a cabo citometría de flujo usando BD-LSRII. La expresión de HLA-DR4 humano fue claramente detectable sobre la superficie de los linfocitos B CD19+ y estaba significativamente regulada en exceso tras la estimulación del agonista poli(LC) del receptor de tipo toll (ver la Fig. 9).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

55 <120> RATONES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE QUE EXPRESAN MOLÉCULAS QUIMÉRICAS DEL COMPLEJO DE HISTOCOMPATIBILIDAD MAYOR (MHC) DE CLASE II

<130> 1210A-WO

60 <140> A asignar

<141> Presentado con la misma fecha que la presente

<150> 61/552.584

<151> 28-10-2011

65 <160> 26

ES 2 640 241 T3

	<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0	
5	<210> 1 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintética	
	<400> 1 cagaacgccca ggctgtaac	19
15	<210> 2 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética	
	<400> 2 ggagagcagg gtcagtcaac	20
25	<210> 3 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintética	
	<400> 3 caccgccact cacagctoct taca	24
35	<210> 4 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Sintética	
	<400> 4 gtgggcacca tcttcatcat tc	22
45	<210> 5 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Sintética	
	<400> 5 cttcctttcc aggtgtgac tc	22
55	<210> 6 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Sintética	
	<400> 6	
65		

ES 2 640 241 T3

```

aggcctgcga tcaggtggca cct 23
<210> 7
<211> 17
5 <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética
10
<400> 7
   tgcggccgat cttagcc 17

<210> 8
15 <211> 18
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Sintética

<400> 8
   ttgaccgatt ccttgccg 18

25 <210> 9
   <211> 21
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

30 <220>
   <223> Sintética

<400> 9
35 acgagcgggt tggcccatt c 21

<210> 10
<211> 140
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 10
45 tttgtaaaca aagtctacc agagacagat gacagacttc agctccaatg ctgattgggt 60
   cctcacttgg gaccaaccct ctcgagtacc gttcgtataa tgtatgctat acgaagttat 120
   atgcatccgg gtaggggagg 140

<210> 11
50 <211> 140
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> Sintética

<400> 11
   cctcgacctg cagccctagg ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaac ggtagagctc 60
   cacaggcatt tgggtgggca gggatggacg gtgactggga caatcgggat ggaagagcat 120
60 agaatgggag ttagggaaga 140

<210> 12
<211> 110
<212> ADN
65 <213> Secuencia artificial

<220>

```

ES 2 640 241 T3

<223> Sintética

<400> 12
tgctgattgg ttcctcactt gggaccaacc ctaagcttta tctatgtcgg gtgcggagaa 60
5 agaggtaatg aatggcaca aggagatcac acacccaaac caaactcgcc 110

<210> 13
<211> 96
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

15 <400> 13
cacatcagtg aggctagaat aaattaaat cgctaataatg aaaatgggga tttgtacctc 60
tgagtgtgaa ggctgggaag actgctttca agggac 96

<210> 14
20 <211> 150
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Sintética

<400> 14
tccatcactt cactgggtag cacagctgta actgtccagc ctgggtaccg agctcggatc 60
30 cactagtaac ggccgccagt gtgctggaat tcgcccttga tcgagctccc tgggctgcag 120
gtggtgggag ttgcgggtgg ggccggttaa 150

<210> 15
<211> 80
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

40 <400> 15
atctccatca gaagggcacc ggtataaactt cgtataaggt atcctatacg aagttatatg 60
catggcctcc gcgccgggtt 80

<210> 16
45 <211> 90
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> Sintética

<400> 16
ataacttcgt ataaggatc ctatacgaag ttatctcogag tggcttacag gtaggtgcgt 60
55 gaagcttota caagcacagt tgccccctgg 90

<210> 17
<211> 90
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
60

<220>
<223> Sintética

<400> 17
65 ctgtttcttc cctaactccc attctatgct cttccatccc gaccggggcc caatctctct 60
ccactacttc ctgcctacat gtagttaggt 90

ES 2 640 241 T3

<210> 18
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 18
 10 caaggtttcc tcctatgatg cttgtgtgaa actcggggcc ggccagcatt taacagtaca 60
 gggatgggag cacagctcac 80
 <210> 19
 <211> 80
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 20 <400> 19
 gaaagcagtc ttcccagcct tcacactcag aggtacaaat cccattttc atattagcga 60
 ttttaattta ttctagcctc 80
 25 <210> 20
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Sintética
 <400> 20
 35 tcttccttaa ctcccattct atgctcttcc atcccagccg eggcccaatc tctctccact 60
 acttcctgcc tacatgtatg 80
 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 45 <400> 21
 ctggcggcctt gaagaatttg g 21
 <210> 22
 <211> 24
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 55 <400> 22
 catgatttcc aggttggcctt tgtc 24
 <210> 23
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Sintética
 65 <400> 23

ES 2 640 241 T3

cgatttgcca gctttgaggc tcaagg 26

<210> 24
<211> 20
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Sintética

<400> 24
aggcttgggt gctccacttg 20

<210> 25
15 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Sintética

<400> 25
gaccctgggtg atgctggaaa c 21

25 <210> 26
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintética

<400> 26
35 caggtgtaaa cctctccact ccgagga 27

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un roedor que comprende, en un locus del gen α del complejo de histocompatibilidad mayor II (MHC II) endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor y/o que comprende, en un locus del gen β del MHC II endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor, en donde una porción humana del polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor comprende los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del MHC II humano, y/o una porción humana del polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor comprende los dominios $\beta 1$ y $\beta 2$ del MHC II humano, y en donde el roedor expresa un complejo MHC II quimérico funcional sobre una superficie de una célula del roedor.
2. El roedor de la reivindicación 1, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor se expresa bajo el control regulador del promotor α del MHC II endógeno de roedor y elementos reguladores y/o la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor se expresa bajo el control regulador del promotor β del MHC II endógeno de roedor y elementos reguladores.
3. El roedor de la reivindicación 1, en donde una porción de roedor del polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor comprende dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido α del MHC II endógeno de roedor y/o una porción de roedor del polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor comprende dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido β del MHC II endógeno de roedor.
4. El roedor de la reivindicación 1, en donde la porción humana del polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor está codificada por un gen de la cadena α de HLA de clase II seleccionado del grupo que consiste en un gen de la cadena α de HLA-DR, un gen de la cadena α de HLA-DQ, y un gen de la cadena α de HLA-DP, y/o la porción humana del polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor está codificada por un gen de HLA de clase II humano seleccionado del grupo que consiste en un gen de la cadena β de HLA-DR, un gen de la cadena β de HLA-DQ, y un gen de la cadena β de HLA-DP.
5. El roedor de la reivindicación 4, en donde la porción humana del polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor está codificada por un gen de la cadena α de HLA-DR4 humano y/o la porción humana del polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor está codificada por un gen de la cadena β de HLA-DR4 humano.
6. El roedor de la reivindicación 1, en donde el roedor es un ratón.
7. Un roedor según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, en un locus del gen MHC II endógeno, una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor, en donde una porción humana del polipéptido α del MHC II quimérico de humano/roedor comprende los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del MHC II humano y una porción humana del polipéptido β del MHC II quimérico de humano/roedor comprende los dominios $\beta 1$ y $\beta 2$ del MHC II humano, y en donde los polipéptidos α del MHC II y β del MHC II quiméricos de humano/roedor forman un complejo MHC II funcional sobre una superficie de una célula del roedor.
8. El roedor de la reivindicación 7, en donde el roedor es un ratón y las porciones de roedor de los polipéptidos α y β del MHC II quimérico están codificadas por los genes α y β de H-2E de ratón.
9. El roedor de la reivindicación 7, en donde el roedor no expresa sobre una superficie celular los polipéptidos endógenos funcionales del MHC II procedentes de sus loci MHC II endógenos de roedor.
10. El roedor según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el roedor es un ratón que comprende, en un locus MHC II endógeno de ratón, una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido α del MHC II quimérico de humano/ratón y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido β del MHC II quimérico de humano/ratón, en donde una porción humana del polipéptido α del MHC II quimérico comprende los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ codificados por un gen de la cadena α de HLA-DR4 humano, y la porción humana del polipéptido β del MHC II quimérico comprende los dominios $\beta 1$ y $\beta 2$ codificados por un gen de la cadena β de HLA-DR4 humano, en donde una porción de ratón del polipéptido α del MHC II quimérico comprende los dominios transmembrana y citoplásmicos de una cadena α de H-2E de ratón, y una porción de ratón del polipéptido β del MHC II quimérico comprende los dominios transmembrana y citoplásmicos de una cadena β de H-2E de ratón, y en donde el ratón expresa un complejo HLA-DR4/H-2E MHC II quimérico funcional sobre una superficie de una célula del ratón.

11. Un método para modificar un locus MHC II de un ratón para expresar un complejo MHC II quimérico de humano/ratón que comprende sustituir en el locus MHC II endógeno de ratón una secuencia de nucleótidos que codifica un complejo MHC II de ratón con una secuencia de nucleótidos que codifica un complejo MHC II quimérico de humano/ratón, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica el complejo MHC II quimérico de humano/ratón comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de un polipéptido α del MHC II humano y dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido α del MHC II de ratón, y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica los dominios $\beta 1$ y $\beta 2$ de un polipéptido β del MHC II humano y dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido β del MHC II de ratón.
12. El método de la reivindicación 11, en donde los polipéptidos α y β del MHC II humano están codificados respectivamente por los genes de la cadena α y β de HLA de clase II humano seleccionados del grupo que consiste en los genes de la cadena α y β de HLA-DR, los genes de la cadena α y β de HLA-DQ, y los genes de la cadena α y β de HLA-DP.
13. El método de la reivindicación 11, en donde los polipéptidos α y β del MHC de ratón están codificados respectivamente por los genes α y β de H-2E de ratón, y una porción humana del complejo MHC II quimérico está codificada por los genes α y β de HLA-DR4 humano.
14. El método de la reivindicación 11, en donde la sustitución se realiza en una única célula ES, y la célula ES única se introduce en un embrión de ratón para obtener un ratón.

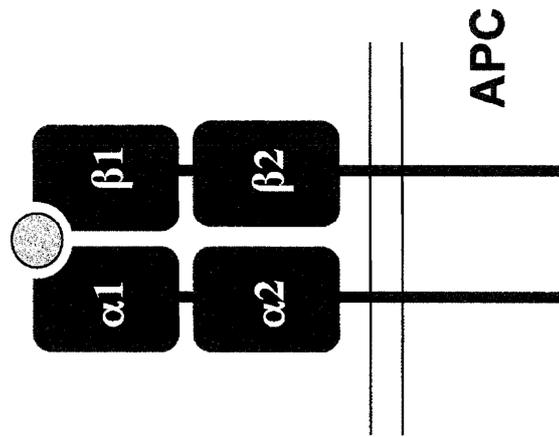


FIG. 1

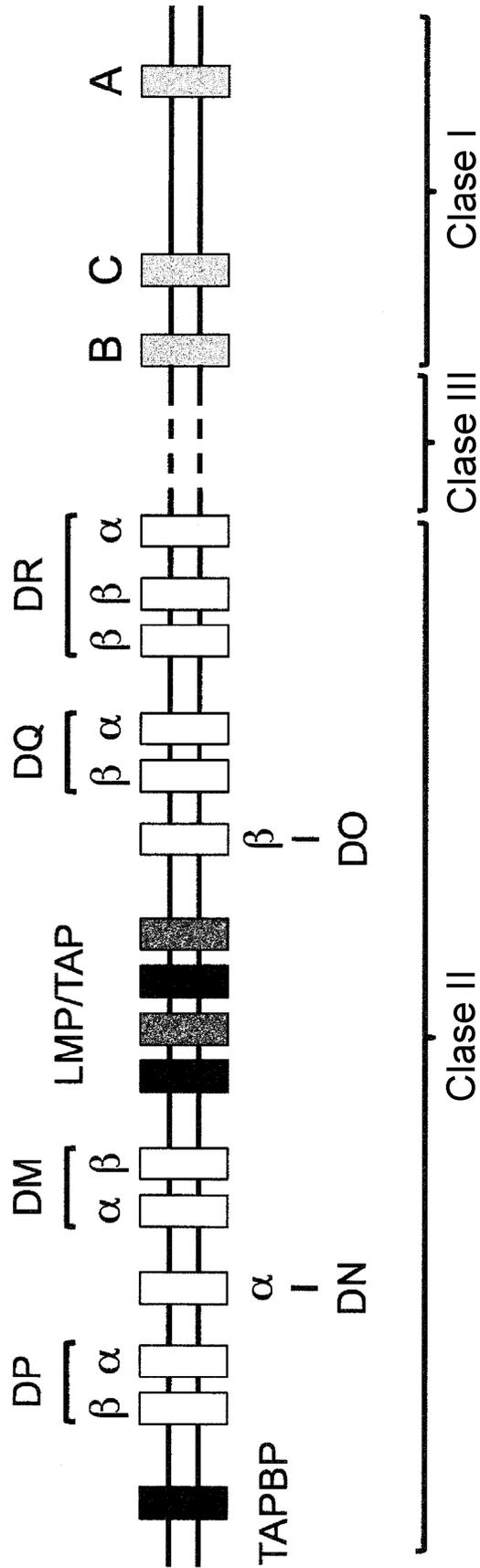


FIG. 2

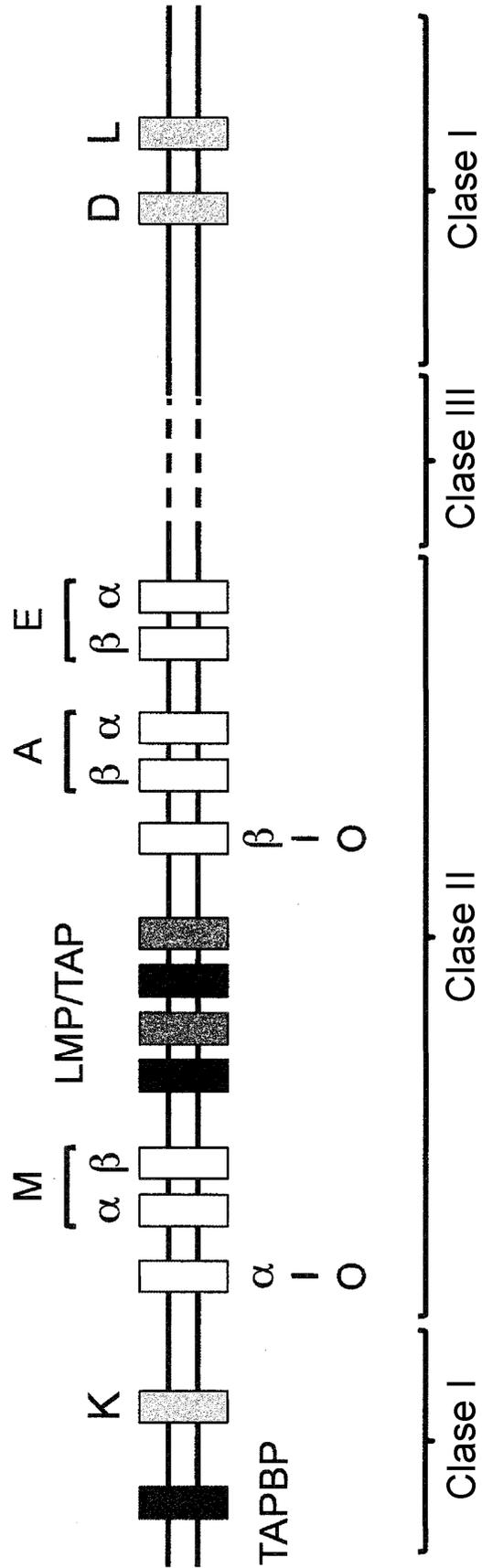


FIG. 3

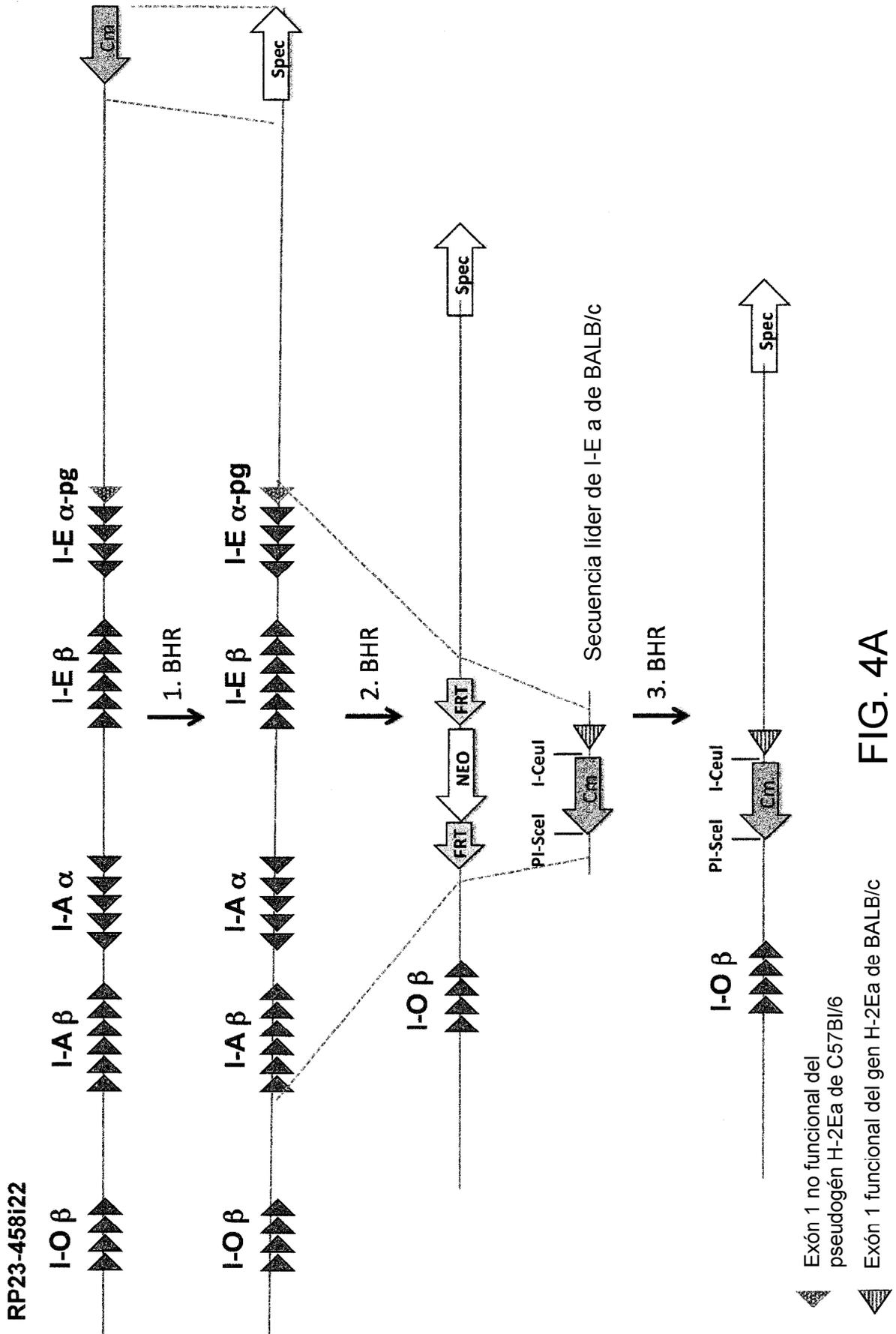


FIG. 4A

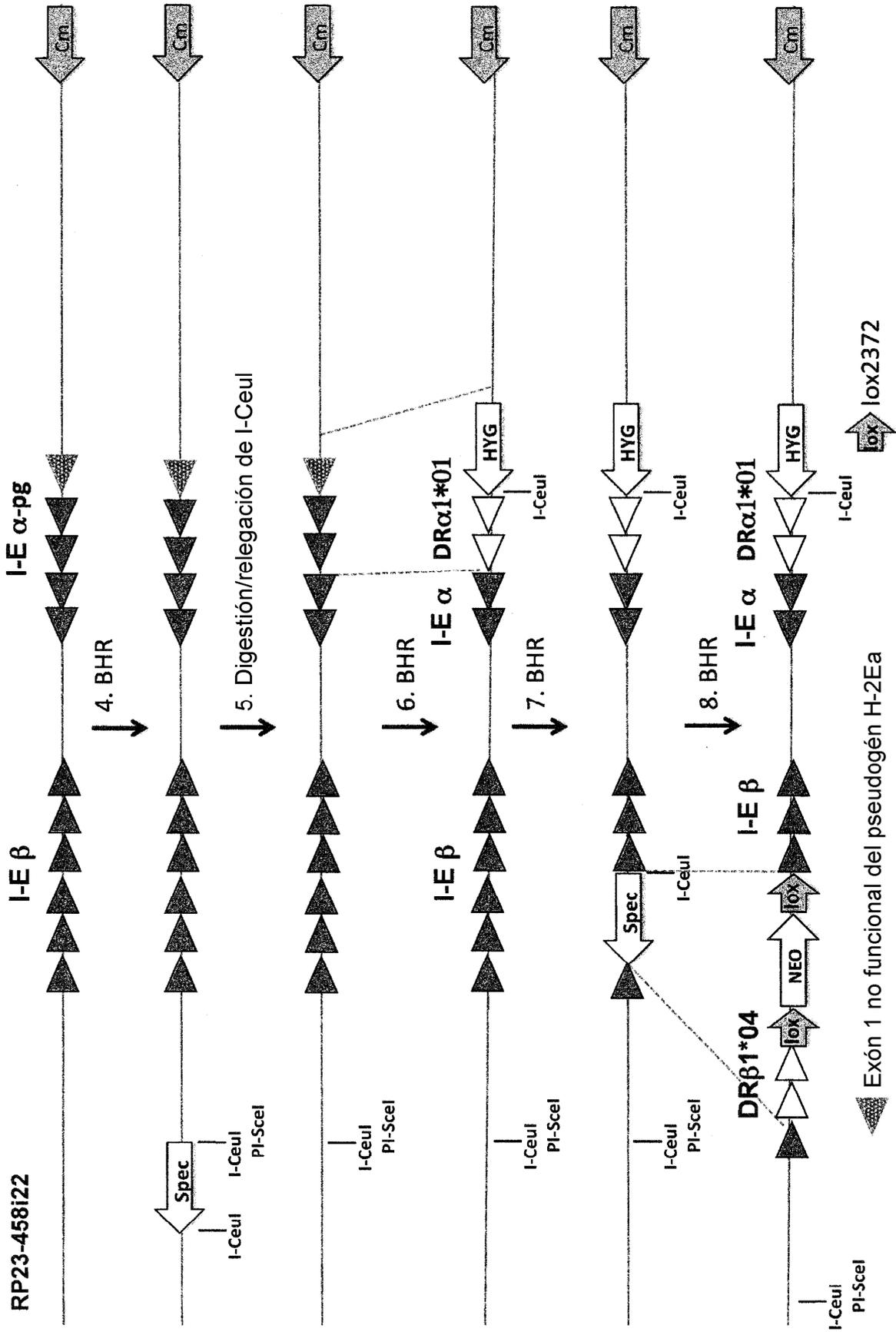


FIG. 4B

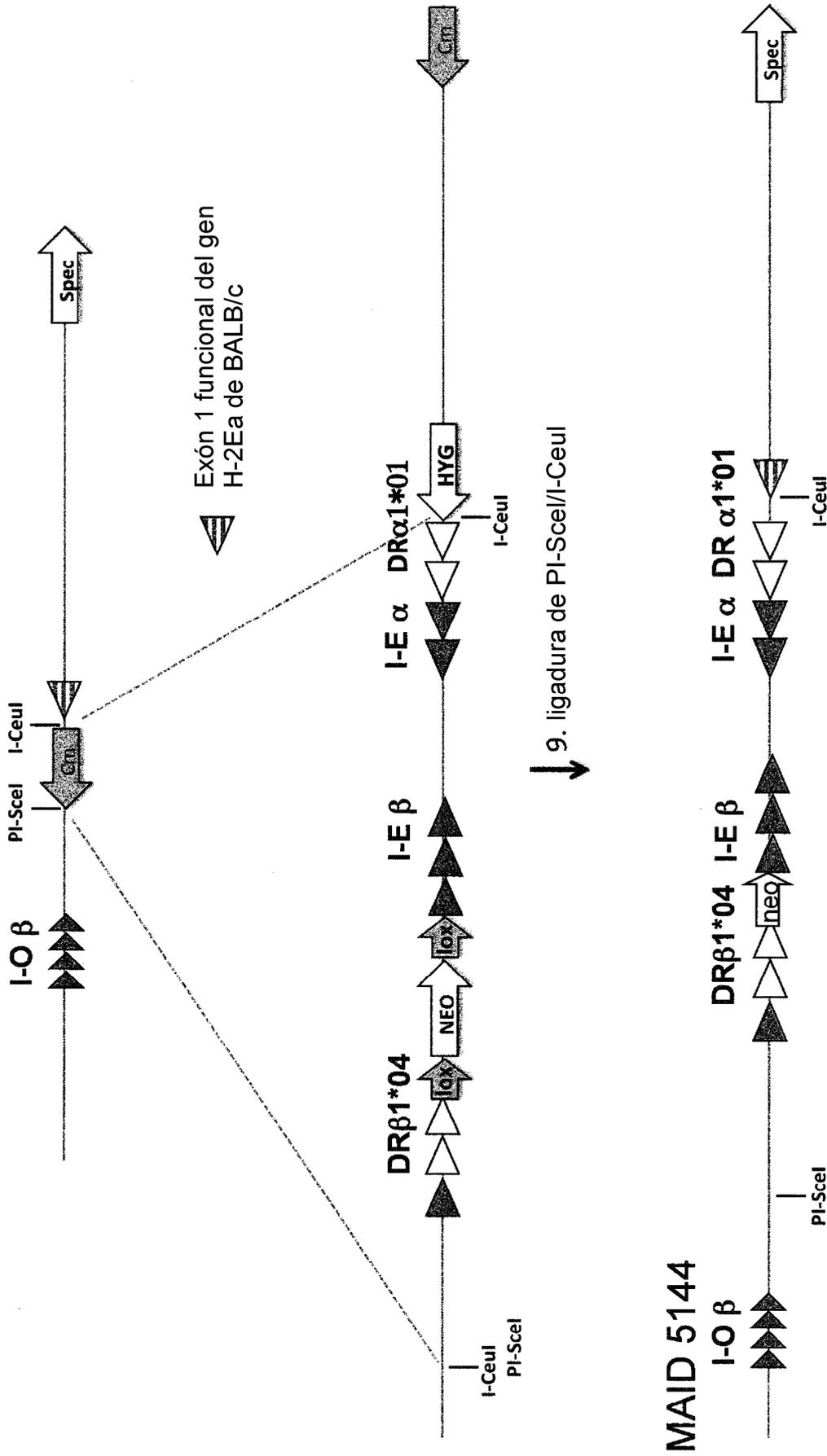


FIG. 4C

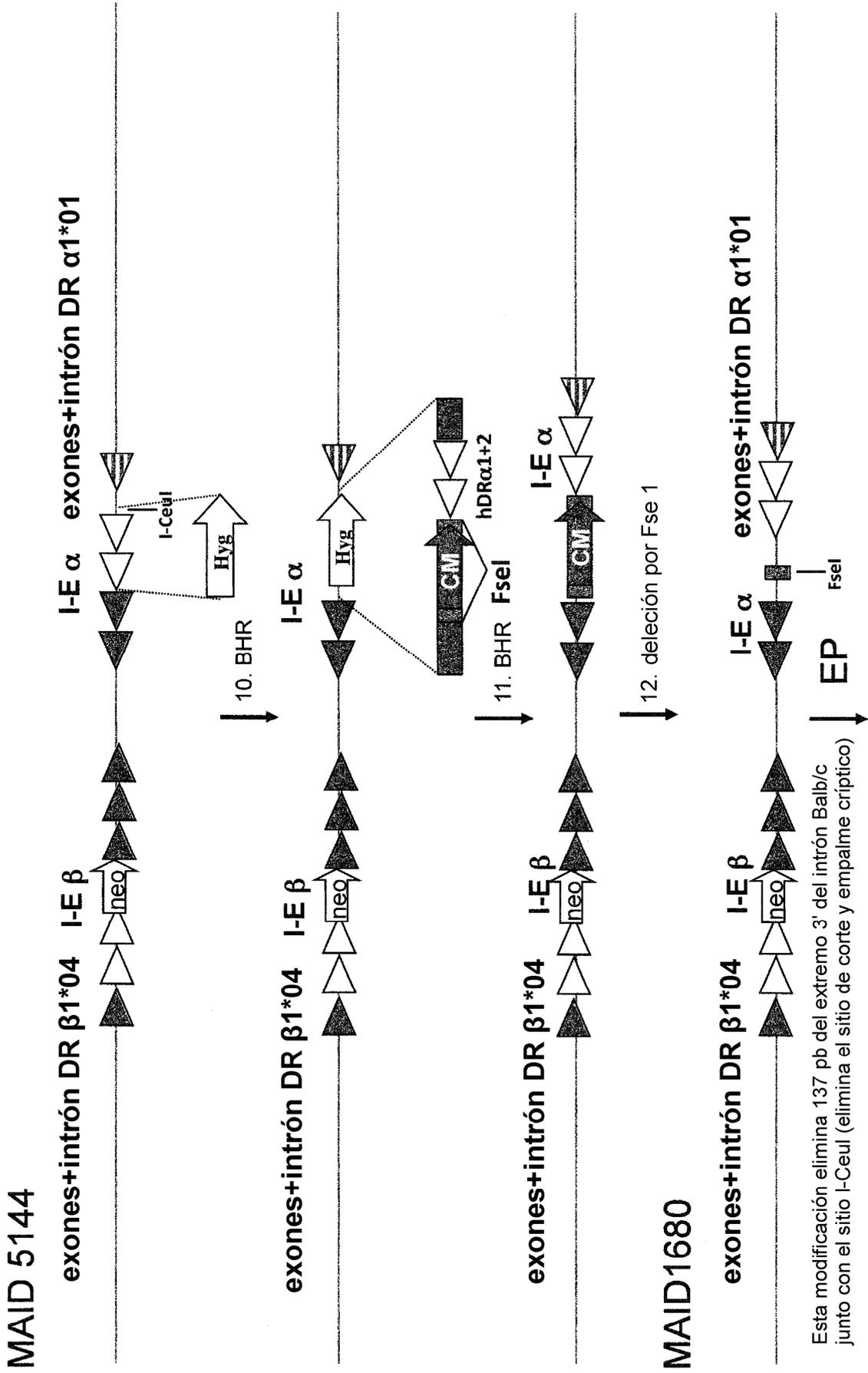


FIG. 4D

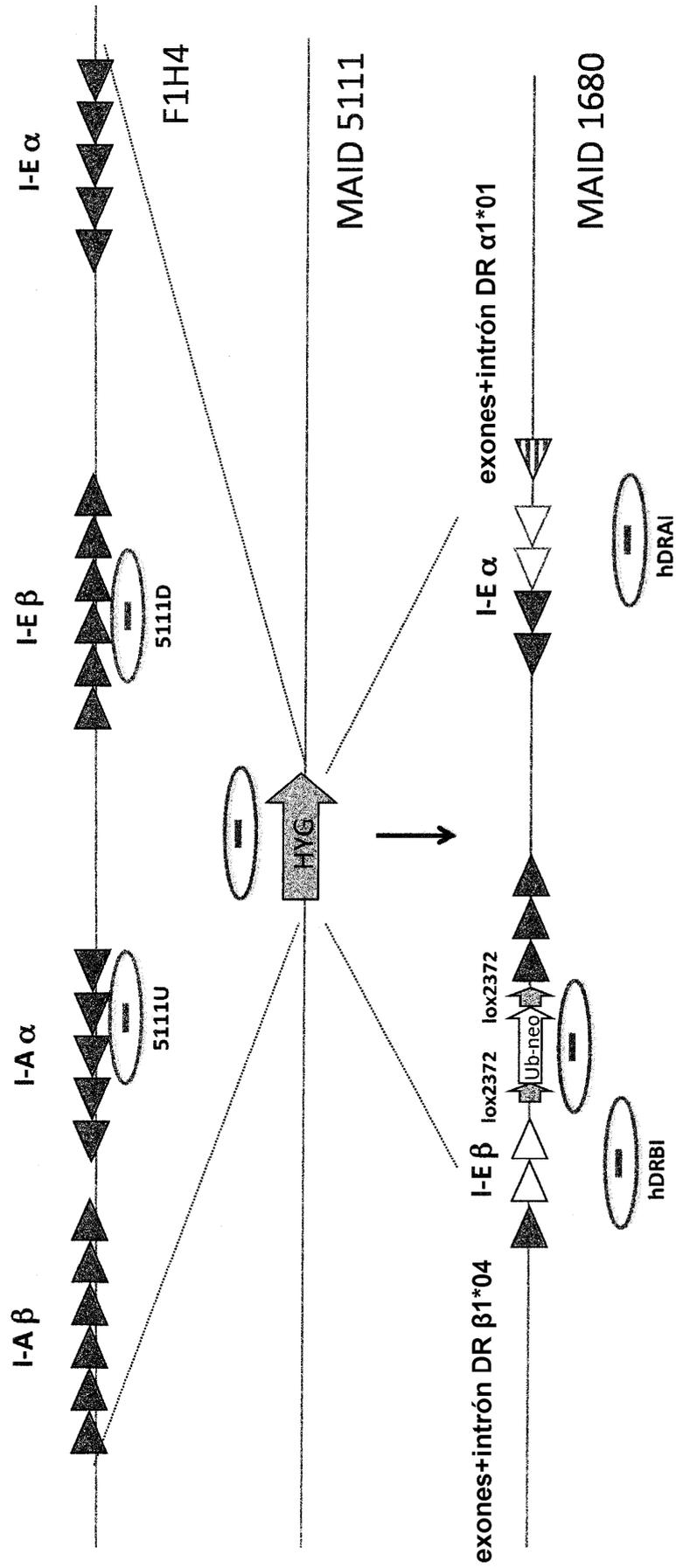


FIG. 5

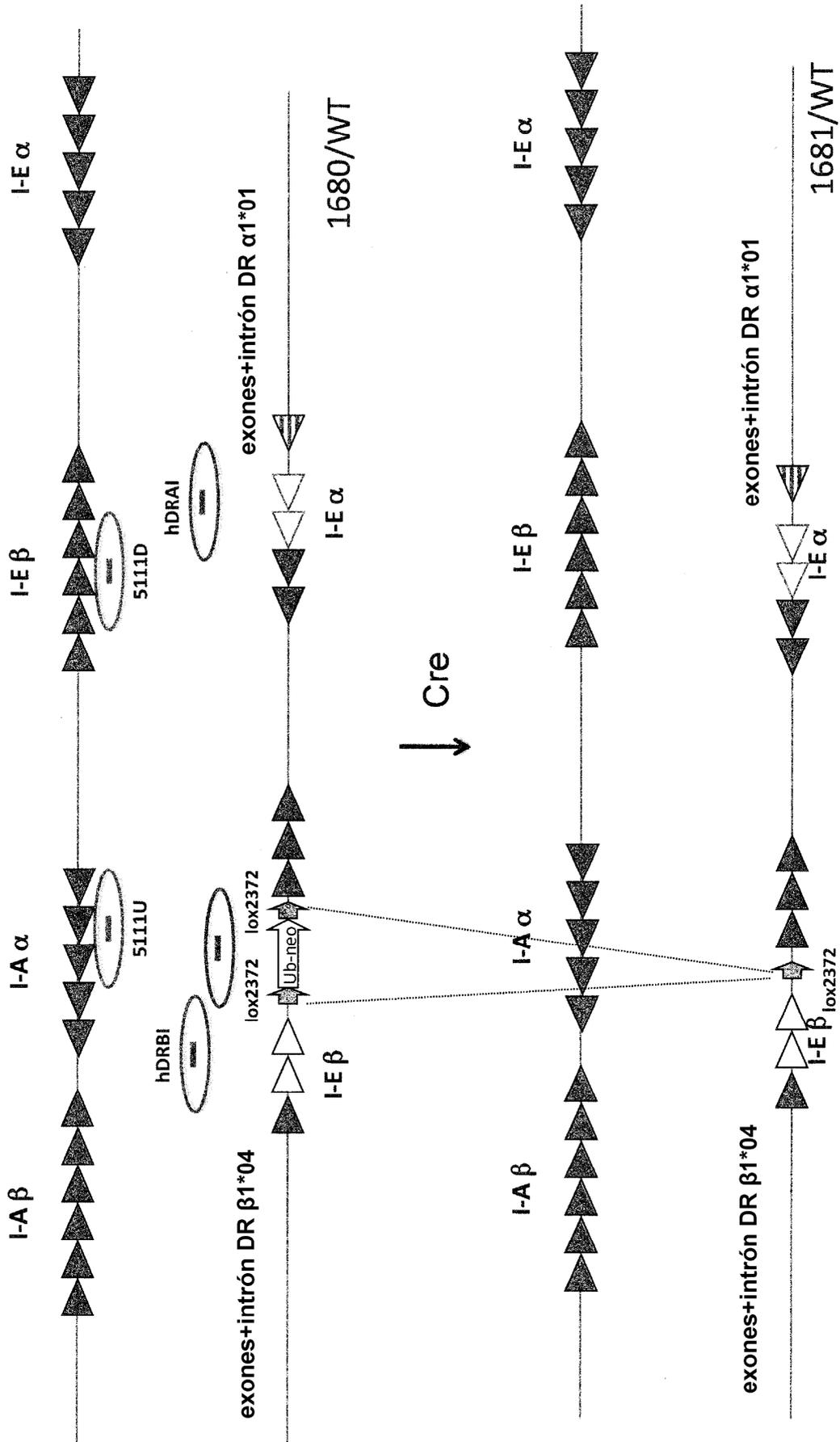


FIG. 6

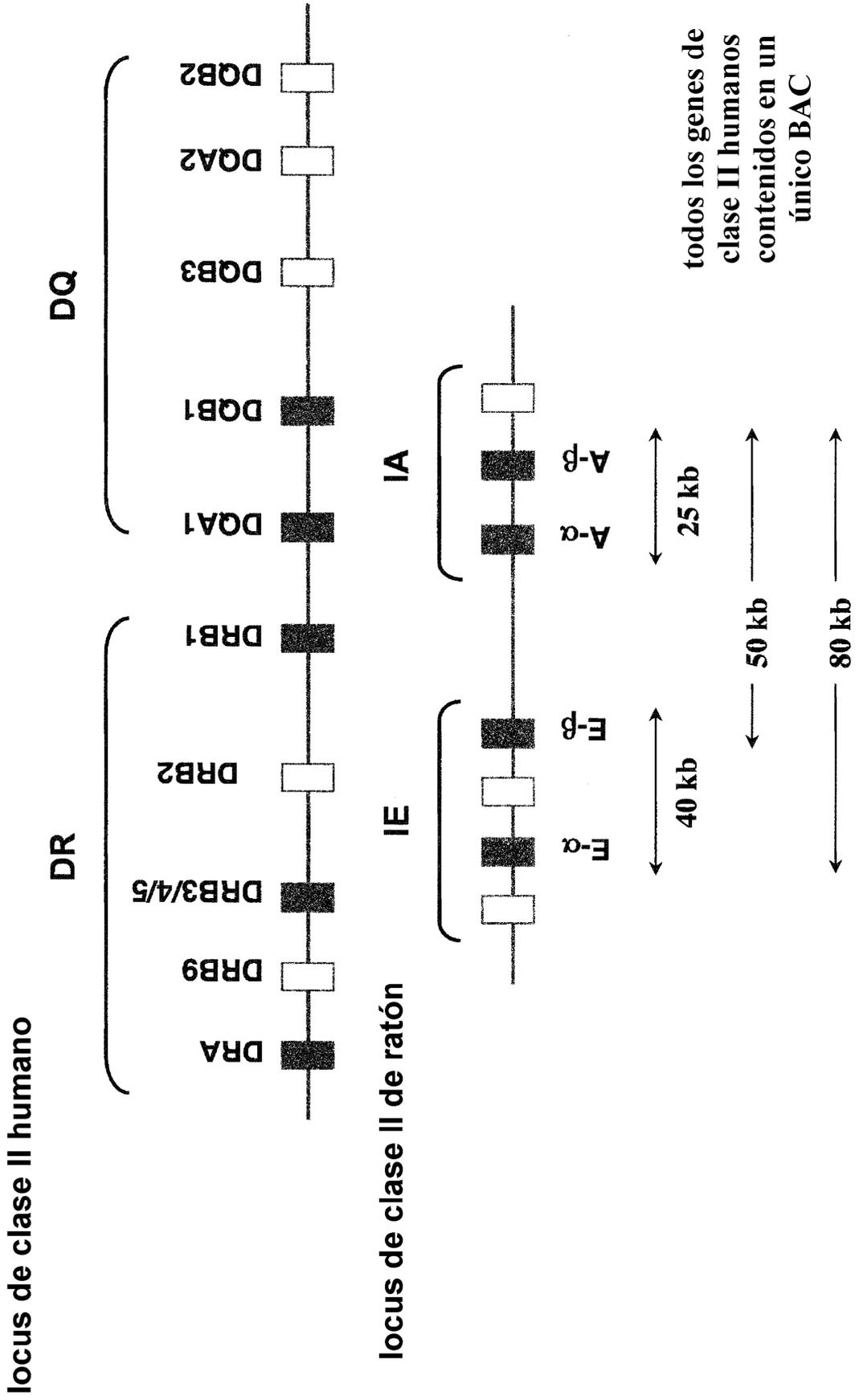


FIG. 7

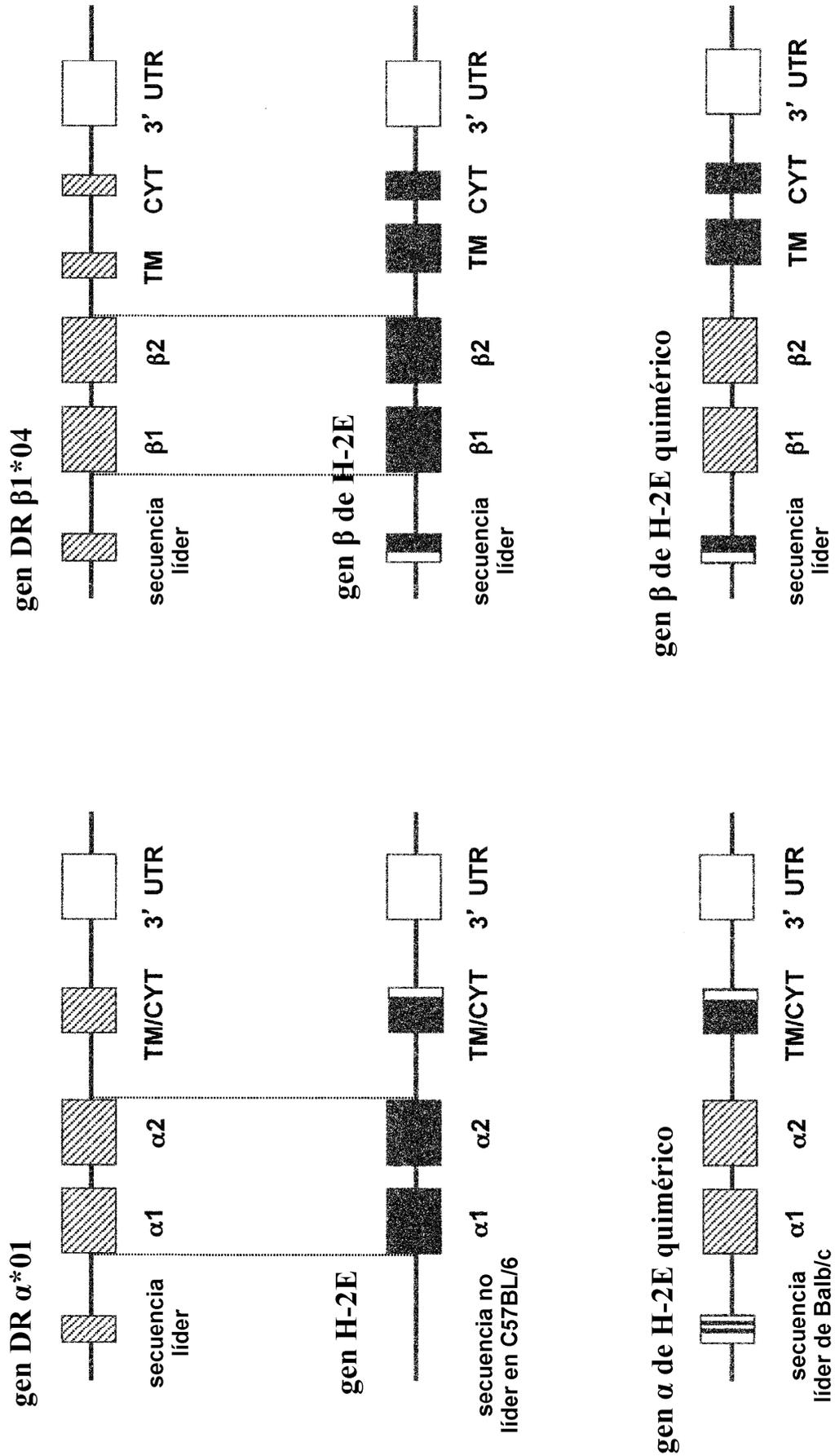


FIG. 8

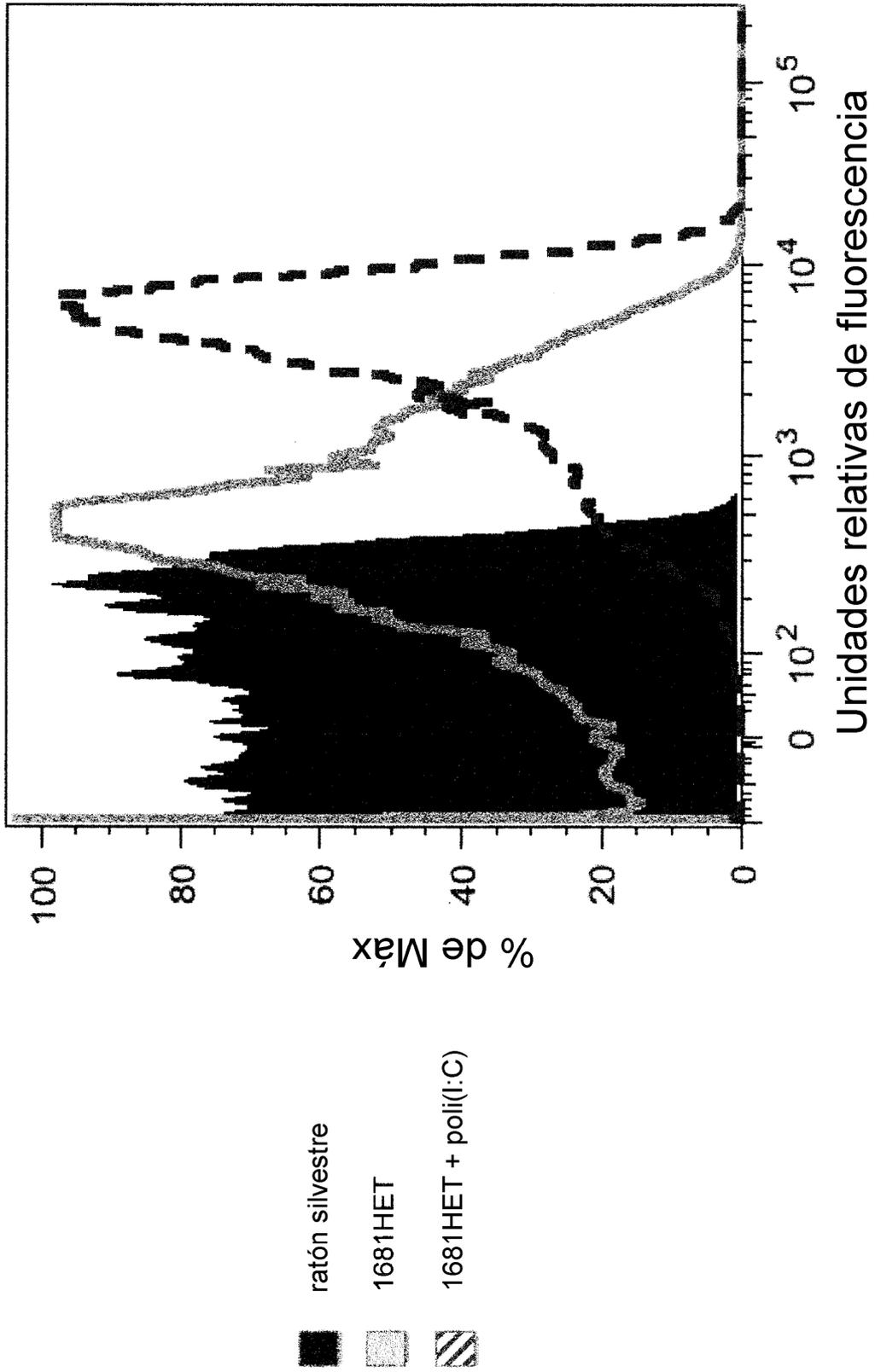


FIG. 9