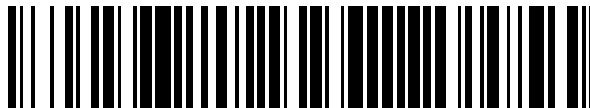


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 517**

51 Int. Cl.:

C07K 14/74 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2012 PCT/US2012/062042**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2013 WO13063346**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2012 E 12787255 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2770821**

54 Título: **Ratones con complejo mayor de histocompatibilidad modificado genéticamente**

30 Prioridad:

28.10.2011 US 201161552587 P

28.10.2011 US 201161552582 P

14.09.2012 US 201261700908 P

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

26.01.2018

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.;
GURER, CAGAN;
MCWHIRTER, JOHN;
VORONINA, VERA;
HARRIS, FAITH y
STEVENS, SEAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 651 517 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 con complejo mayor de histocompatibilidad modificado genéticamente

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un roedor modificado genéticamente (p. ej., un ratón o una rata) que expresa una molécula humana o humanizada del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I. La invención también se refiere a un roedor modificado genéticamente que expresa una proteína humana o humanizada de MHC I (p. ej., cadena α de MHC I) y/o una $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. La invención proporciona además métodos para producir un roedor modificado genéticamente que expresa la proteína de MHC de clase I humana o humanizada (p. ej., la cadena α de MHC I) y/o $\beta 2$ microglobulina. También se proporcionan métodos para modificar un locus de MHC I y/o de $\beta 2$ microglobulina de un roedor, p. ej., un ratón o una rata, para que exprese una MHC I y/o una $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada.

15 **Antecedentes de la invención**

En la respuesta inmunológica adaptativa, las moléculas receptoras reconocen los antígenos extraños sobre los linfocitos B (p. ej., inmunoglobulinas) y los linfocitos T (p. ej., 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 mayor de histocompatibilidad (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).

Los loci del MHC presentan el mayor polimorfismo del genoma; algunos genes están representados por >300 alelos (p. ej., 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 inmunológica.

Tanto los seres humanos como los ratones tienen genes del MHC de clase I (véase la Fig. 2 y la Fig. 3). En seres humanos, los genes de clase I clásicos se denominan HLA-A, HLA-B y HLA-C, mientras que en ratones son H-2K, H-2D y H-2L. Las moléculas de clase I consisten en dos cadenas: una cadena α polimórfica (en ocasiones citada como cadena pesada) y una cadena más pequeña, denominada $\beta 2$ -microglobulina (también conocida como cadena ligera), que normalmente no es polimórfica (Fig. 1). Estas dos cadenas forman un heterodímero no covalente sobre la superficie celular. La cadena α contiene tres dominios ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$). El exón 1 del gen de cadena α codifica la secuencia líder, los exones 2 y 3 codifican los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, el exón 4 codifica el dominio $\alpha 3$, el exón 5 codifica el dominio transmembrana y los exones 6 y 7 codifican la cola citoplasmática. La cadena α forma un surco de unión peptídica que implica a los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (que se asemejan a los dominios similares a Ig) seguido del dominio $\alpha 3$, que es similar a $\beta 2$ -microglobulina.

La $\beta 2$ microglobulina es una proteína no glucosilada de 12 kDa; una de sus funciones es estabilizar a la cadena α de MHC de clase I. A diferencia de la cadena α , la $\beta 2$ microglobulina no atraviesa la membrana. El locus de $\beta 2$ microglobulina humana se encuentra en el cromosoma 15, mientras que el locus de ratón está en el cromosoma 2. El gen de $\beta 2$ microglobulina consiste en 4 exones y 3 intrones. Se encuentran presentes formas circulantes de $\beta 2$ microglobulina en el suero, la orina y otros fluidos corporales; por lo tanto, la $\beta 2$ microglobulina asociada de manera no covalente a MHC I puede intercambiarse con la $\beta 2$ microglobulina circulante en condiciones fisiológicas.

Las moléculas de MHC de clase I se expresan en todas las células nucleadas, incluidas las células tumorales. Se expresan específicamente en los linfocitos T y B, los macrófagos, las células dendríticas y los neutrófilos, entre otras células, y tienen la función de presentar fragmentos peptídicos (típicamente de 8-10 aminoácidos de longitud) sobre la superficie de los linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL). Los CTL están especializados en eliminar cualquier célula que porte un péptido unido a MHC I reconocido por su propio TCR unido a membrana. Cuando una célula muestra péptidos procedentes de proteínas celulares que no están presentes normalmente (p. ej., de origen vírico, tumoral u otro no propio), dichos péptidos se reconocen por los CTL, que se convierten en activos y eliminan a la célula que presenta el péptido.

De forma típica, la presentación de proteínas normales (es decir, propias) en el contexto de las moléculas de MHC I no desencadena la activación de los CTL debido a los mecanismos de tolerancia. Sin embargo, en algunas enfermedades (p. ej., el cáncer, enfermedades autoinmunes), los péptidos procedentes de autoproteínas se convierten en una diana del componente celular del sistema inmunológico, lo que da lugar a la destrucción de las células que presentan dichos

péptidos. Aunque ha habido avances en el reconocimiento de algunos autoantígenos que desencadenan una respuesta inmunológica celular (p. ej., antígenos asociados con diversos cánceres), para mejorar la identificación de péptidos reconocidos por CTL humanos a través de moléculas de MHC de clase I, sigue existiendo la necesidad de sistemas tanto *in vivo* como *in vitro* que imiten aspectos del sistema inmunológico celular humano. Los sistemas que imitan el sistema inmunológico celular humano pueden usarse para identificar antígenos asociados con enfermedades para desarrollar agentes terapéuticos para humanos, p. ej., vacunas y otros agentes biológicos. Los sistemas para evaluar el reconocimiento de antígenos en el contexto del sistema inmunológico humano pueden ayudar a identificar poblaciones de CTL terapéuticamente útiles (p. ej., útiles para estudiar y combatir enfermedades humanas). Dichos sistemas también pueden ayudar a mejorar la actividad de poblaciones de CTL humanos para combatir de una manera más eficaz infecciones y entidades que portan antígenos extraños. Por lo tanto, existe la necesidad de sistemas biológicos (p. ej., animales modificados genéticamente) que puedan generar un sistema inmunológico que muestre componentes que imiten la función del sistema inmunológico humano.

Sumario de la invención

Se proporciona un sistema biológico para generar o identificar péptidos que se asocian con las proteínas del MHC de clase I humanas y quimeras de las mismas que se unen a los linfocitos T CD8+. Se proporcionan roedores que comprenden células no humanas que expresan moléculas humanas o humanizadas que funcionan en las respuestas inmunológicas celulares.

En la presente memoria se proporciona un roedor (p. ej., un ratón o una rata) que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico de MHC I de humano/no humano (p. ej., de humano/roedor, p. ej., de humano/ratón o de humano/rata), en donde una parte humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido de MHC I humano. Específicamente, en la presente memoria se proporciona un roedor que comprende en un locus de MHC I endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico de MHC I humano, en donde una parte humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido de MHC I humano y en donde el animal expresa el polipéptido quimérico de MHC I de humano/no humano. En un aspecto, el roedor no expresa un dominio extracelular de un polipéptido de MHC I no humano endógeno a partir de un locus de MHC I no humano endógeno. En un aspecto de la invención, el roedor, p. ej., un ratón o una rata, comprende dos copias del locus de MHC I que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido quimérico de MHC I de humano/roedor, p. ej., de humano/ratón o de humano/rata. En otro aspecto de la invención, el roedor comprende una copia del locus de MHC I que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico de MHC I de humano/roedor. Por lo tanto, el animal puede ser homocigoto o heterocigoto para el locus de MHC I que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido quimérico de MHC I de humano/roedor. En diversas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico de MHC I de humano/roedor está comprendida en la línea germinal del roedor.

En un aspecto, la secuencia de nucleótidos que codifica el MHC I quimérico de humano/roedor está unida operativamente a elementos reguladores endógenos de roedor, p. ej., promotor, potenciador, silenciador, etc. En una realización, una porción humana del polipéptido quimérico comprende una secuencia líder humana. La porción humana del polipéptido quimérico comprende los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del polipéptido de MHC I humano. El polipéptido de MHC I humano puede seleccionarse de un grupo que consiste en HLA-A, HLA-B y HLA-C. En una realización, el polipéptido de MHC I humano es un polipéptido HLA-A2, p. ej., un polipéptido HLA-A2.1.

El animal no humano modificado genéticamente es un roedor. En una realización, el roedor es un ratón. Por lo tanto, en una realización, el locus endógeno de roedor es un locus de ratón, p. ej., un locus de H-2K, H-2D o H-2L de ratón. La porción de roedor del polipéptido quimérico de MHC I de humano/roedor comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos del polipéptido endógeno de MHC I de roedor. Por lo tanto, en una realización en donde el roedor es un ratón, el locus endógeno de MHC I de roedor puede ser un locus de H-2K (p. ej., el locus de H-2Kb) y el polipéptido endógeno de MHC I de roedor puede ser un polipéptido H-2K; por lo tanto, el polipéptido quimérico de MHC I de humano/roedor puede comprender los dominios transmembrana y citoplasmáticos del polipéptido H-2K. En otra realización en donde el animal roedor es un ratón, el locus endógeno de MHC I de roedor puede ser un locus de H-2D y el polipéptido endógeno de MHC I de roedor puede ser un polipéptido H-2D; por lo tanto, el polipéptido quimérico de MHC I de humano/roedor puede comprender los dominios transmembrana y citoplasmáticos del polipéptido H-2D. De manera similar, en otra realización, el locus endógeno no de MHC I puede ser un locus de H-2L y el polipéptido endógeno de MHC I de roedor puede ser un polipéptido H-2L; por lo tanto, el polipéptido quimérico de MHC I de humano/roedor puede comprender los dominios transmembrana y citoplasmáticos del polipéptido H-2L.

También se proporciona en la presente memoria un ratón que comprende en un locus endógeno de H-2K una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico de MHC I de humano/ratón, en donde una parte humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido HLA-A humano (p. ej., HLA-A2) y una parte de ratón comprende los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido H-2K de ratón y en donde el ratón expresa el polipéptido quimérico de MHC I de humano/ratón. En algunas realizaciones, el ratón no expresa un dominio extracelular del polipéptido H-2K de ratón a partir de un locus endógeno de H-2K. En un aspecto, la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico de MHC I de humano/ratón está unida operativamente a elementos

reguladores endógenos de ratón. La porción humana del polipéptido quimérico puede comprender una secuencia líder humana. También comprende los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del polipéptido de MHC I humano. El polipéptido de MHC I humano puede ser un polipéptido HLA-A, p. ej., un polipéptido HLA-A2.1. En un aspecto, el locus de H-2K de ratón es un locus de H-2Kb.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a un roedor (p. ej., un ratón o una rata) que además comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado. Por lo tanto, en la presente memoria se proporciona un roedor que además comprende en un locus endógeno de $\beta 2$ microglobulina no humana una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado, en donde el roedor expresa el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado. En un aspecto, el roedor no expresa un polipéptido endógeno de $\beta 2$ microglobulina de roedor funcional a partir de un locus endógeno de $\beta 2$ microglobulina de roedor. En un aspecto, el roedor comprende dos copias del locus de $\beta 2$ microglobulina que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado; en otra realización, el animal comprende una copia del locus de $\beta 2$ microglobulina que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado. Por lo tanto, el animal puede ser homocigoto o heterocigoto para el locus de $\beta 2$ microglobulina que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado. En diversas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado está comprendida en la línea germinal del roedor. En una realización, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de $\beta 2$ microglobulina humana. En una realización, el polipéptido es capaz de unirse a una proteína de MHC I.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado está unida operativamente a elementos reguladores endógenos de $\beta 2$ microglobulina de roedor. En un aspecto, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado comprende una secuencia de nucleótidos expuesta del exón 2 al exón 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano. En otro aspecto, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado comprende las secuencias de nucleótidos expuestas en los exones 2, 3 y 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano. En un aspecto adicional, la secuencia de nucleótidos también comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en el exón 1 de un gen de $\beta 2$ microglobulina no humano.

También se proporciona un ratón que además comprende en un locus endógeno de $\beta 2$ microglobulina una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado, en donde el ratón expresa el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado. En algunas realizaciones, el ratón no expresa una $\beta 2$ microglobulina endógena de ratón funcional a partir de un locus endógeno de $\beta 2$ microglobulina. La secuencia de nucleótidos puede estar unida a elementos reguladores endógenos de ratón. En un aspecto, la secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos expuesta del exón 2 al exón 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado puede comprender las secuencias de nucleótidos expuestas en los exones 2, 3 y 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano. La secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado puede también comprender una secuencia de nucleótidos del exón 1 de un gen de $\beta 2$ microglobulina de ratón. En una realización, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de $\beta 2$ microglobulina humana. En una realización, el polipéptido es capaz de unirse a una proteína de MHC I.

La invención proporciona además un ratón, que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico de MHC I de humano/roedor y una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado. En una realización, la invención proporciona un roedor que comprende en su genoma una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico de MHC I de humano/roedor, en donde una parte humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido de MHC I humano; y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado, en donde la primera secuencia de nucleótidos está ubicada en un locus endógeno de MHC I de roedor y la segunda secuencia de nucleótidos está ubicada en un locus endógeno de $\beta 2$ microglobulina de roedor y en donde el roedor expresa el polipéptido quimérico de MHC I de humano/no humano y el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado. En un aspecto, el roedor es un ratón. Por lo tanto, el locus endógeno de MHC I puede seleccionarse de un grupo que consiste en el locus de H-2K, H-2D y H-2L. En una realización, el locus endógeno de ratón es un locus de H-2K (p. ej., el locus de H-2Kb). En una realización, el polipéptido de MHC I humano se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido HLA-A, HLA-B y HLA-C. En un aspecto, el polipéptido de MHC I humano es HLA-A, p. ej., HLA-A2 (p. ej., HLA-A2.1). En diversas realizaciones, las secuencias de nucleótidos primera y segunda están comprendidas en la línea germinal del roedor, p. ej., ratón o rata.

Por lo tanto, la invención proporciona un ratón que comprende en su genoma una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico de MHC I de humano/ratón, en donde una parte humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de un HLA-A humano (p. ej., HLA-A2) y una parte de ratón comprende los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un H-2K de ratón; y una segunda secuencia de nucleótidos que

codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado en donde la primera secuencia de nucleótidos está ubicada en un locus endógeno de H-2K y la segunda secuencia de nucleótidos está ubicada en un locus endógeno de $\beta 2$ microglobulina de ratón y en donde el ratón expresa el polipéptido quimérico de MHC I de humano/ratón y el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado. En una realización, el ratón, que comprende tanto el polipéptido quimérico de MHC I como el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado, no expresa un dominio extracelular de un polipéptido endógeno de MHC I de ratón (p. ej., el polipéptido H-2K de ratón) y/o un polipéptido funcional endógeno de $\beta 2$ microglobulina de ratón a partir de sus respectivos locus endógenos. En un aspecto, el ratón comprende dos copias de cada una de las secuencias de nucleótidos primera y segunda. En otro aspecto, el ratón comprende una copia de la primera secuencia de nucleótidos y una copia de la segunda. Por lo tanto, el ratón puede ser homocigoto o heterocigoto tanto para la primera secuencia de nucleótidos como para la segunda.

En un aspecto, la primera secuencia de nucleótidos está unida operativamente a elementos reguladores endógenos de MHC I de ratón y la segunda secuencia de nucleótidos está unida operativamente a elementos endógenos de $\beta 2$ microglobulina de ratón. La porción humana del polipéptido quimérico comprende los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del polipéptido de MHC I humano. La segunda secuencia de nucleótidos puede comprender una secuencia de nucleótidos expuesta del exón 2 al exón 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano. Como alternativa, la segunda secuencia de nucleótidos puede comprender secuencias de nucleótidos expuestas en los exones 2, 3 y 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano. En un aspecto, el ratón que comprende tanto el polipéptido quimérico de MHC I como el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado puede ser tal que la expresión de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada aumenta la expresión del polipéptido quimérico de MHC I de humano/ratón en comparación con la expresión del polipéptido quimérico de MHC I de humano/ratón en ausencia de la expresión del polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado.

También se proporcionan métodos para producir los roedores modificados genéticamente descritos en la presente memoria. Por lo tanto, en una realización se proporciona un método para modificar un locus de MHC I de un roedor (p. ej., un ratón o una rata) para expresar un polipéptido quimérico de MHC I de humano/roedor (p. ej., de humano/ratón o de humano/rata), en donde el método comprende reemplazar en el locus de MHC I endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de un polipéptido de MHC I de roedor por una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de un polipéptido de MHC I humano. En otra realización, se proporciona un método para modificar un locus de $\beta 2$ microglobulina de un roedor (p. ej., un ratón o una rata) para que exprese un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado, en donde el método comprende reemplazar en el locus endógeno de $\beta 2$ microglobulina de roedor (p. ej., ratón o rata) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina de roedor (p. ej., de ratón o de rata) por una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado. En dichos métodos, el reemplazo puede efectuarse en una sola célula ES y la célula ES individual puede introducirse en un roedor (p. ej., un ratón o una rata) para producir un embrión. Puede cruzarse al roedor resultante (p. ej., un ratón o una rata) para generar un animal doblemente humanizado.

En la presente memoria se describe un método para producir roedores doblemente humanizados (p. ej., ratones o ratas). En la presente memoria se describe un método para producir un ratón modificado genéticamente que comprende (a) modificar un locus de MHC I de un primer ratón para que exprese un polipéptido quimérico de MHC I de humano/ratón que comprende reemplazar en el locus endógeno de MHC I de ratón una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de un polipéptido de MHC I de ratón por una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de un polipéptido de MHC I humano, (b) modificar un locus de $\beta 2$ microglobulina de un segundo ratón para que exprese un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado que comprende reemplazar en el locus endógeno de $\beta 2$ microglobulina de ratón una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina de ratón por una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado; y (c) cruzar a los ratones primero y segundo para generar un ratón modificado genéticamente que comprende en su genoma una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico de MHC I de humano/ratón y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado, en donde el ratón modificado genéticamente expresa el polipéptido quimérico de MHC I de humano/ratón y el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado. En algunas realizaciones, el locus de MHC I se selecciona de H-2K, H-2D y H-2L; en algunas realizaciones, el polipéptido de MHC I humano se selecciona de HLA-A, HLA-B y HLA-C. En una realización, el locus de MHC I es un locus de H-2K, el polipéptido de MHC I humano es HLA-A (p. ej., HLA-A2), y el ratón expresa un polipéptido quimérico de HLA-A/H-2K (p. ej., un polipéptido HLA-A2/H-2K). En un aspecto, el polipéptido quimérico de HLA-A2/H-2K comprende un dominio extracelular del polipéptido HLA-A2 y los dominios citoplasmáticos y transmembrana de un polipéptido H-2K. En un aspecto, la segunda secuencia de nucleótidos comprende las secuencias de nucleótidos expuestas en los exones 2, 3 y 4 (p. ej., del exón 2 al exón 4) de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano y una secuencia de nucleótidos expuesta en el exón 1 de un gen de $\beta 2$ microglobulina de ratón.

También se describen en la presente memoria células, p. ej., células presentadoras de antígenos aisladas, procedentes de roedores, p. ej., de ratones o ratas descritos en la presente memoria. También se proporcionan tejidos y embriones procedentes de los roedores descritos en la presente memoria.

En la presente memoria se describen métodos para la identificación de antígenos o de epítomos antigénicos que desencadenan respuestas inmunológicas, métodos para evaluar un candidato a vacuna, métodos para la identificación de linfocitos T de alta afinidad por patógenos humanos o antígenos del cáncer.

5 Cualquiera de 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.

Breve descripción de los dibujos

15 La **Fig. 1** es un dibujo esquemático de los cuatro dominios de una molécula de MHC de clase I: cadena α que contiene los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ y el cuarto dominio asociado de manera no covalente, $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2m$). 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.

25 La **Fig. 4** ilustra una construcción de vector vírico que contiene un ADNc que codifica un polipéptido quimérico de HLA-A/H-2K con un indicador de IRES-GFP (**A**); e histogramas que comparan la expresión de HLA-A2 humano en células MG87 transducidas con HLA-A2 (línea discontinua), HLA-A2/H-2K (línea de puntos) o sin transducir (línea continua) tanto solas (a la izquierda) como transducidas conjuntamente con $\beta 2$ microglobulina humanizada (a la derecha) (**B**). Los datos de las ventanas horizontales presentadas gráficamente en (**B**) se ilustran como porcentaje de células que expresan la construcción en la tabla en (**C**).

30 La **Fig. 5** es un diagrama esquemático (no a escala) de la estrategia de direccionamiento usada para producir un locus quimérico de H-2K que expresa una región extracelular de una proteína HLA-A2 humana. Las secuencias de ratón se representan en negro y las secuencias humanas se representan en blanco. L=líder, UTR=región no traducida, TM=dominio transmembrana, CYT=dominio citoplasmático, HYG=higromicina.

35 La **Fig. 6A** demuestra la expresión (% de células totales) de HLA-A2 (a la izquierda) y H-2K (a la derecha) en células aisladas de un ratón de tipo natural (WT) o un ratón heterocigoto que porta el locus quimérico de HLA-A2/H-2K (HLA-A/H-2K HET).

40 La **Fig. 6B** es una gráfica de puntos de la expresión *in vivo* de la proteína quimérica HLA-A2/H-2K en un ratón heterocigoto que porta un locus quimérico de HLA-A2/H-2K.

45 La **Fig. 7** muestra una estrategia de direccionamiento (no a escala) para la humanización de un gen de $\beta 2$ microglobulina en un locus de $\beta 2$ microglobulina de ratón. Las secuencias de ratón se encuentran en negro y las secuencias humanas se encuentran en blanco. NEO=neomicina.

50 La **Fig. 8** muestra una gráfica de puntos representativa de la expresión de HLA de clase I y de $\beta 2$ microglobulina humana en células aisladas de la sangre de ratones de tipo natural (WT), ratones heterocigotos para HLA-A2/H-2K quimérica y ratones heterocigotos para $\beta 2$ microglobulina humanizada (dobles heterocigotos; clase I/ $\beta 2m$ HET).

55 La **Fig. 9** muestra un histograma representativo de la expresión de HLA de clase I humana (eje X) en células aisladas de la sangre de ratones de tipo natural (WT), heterocigotos para HLA-A2/H-2K quimérica (clase I HET) y dobles heterocigotos para HLA-A2/H2K/ $\beta 2$ microglobulina humanizada quimérica (clase I/ $\beta 2m$ HET).

60 La **Fig. 10** muestra los resultados de los ensayos Elispot de IFN γ para linfocitos T humanos expuestos a células presentadoras de antígenos (APC) de ratones de tipo natural (APC WT) o ratones heterocigotos tanto para HLA-A2/H-2K quimérica como para $\beta 2$ microglobulina humanizada (APC doble HET) en presencia de péptidos de gripe (a la izquierda) o de EBV (a la derecha). El análisis estadístico se efectuó usando ANOVA de una vía con una prueba posterior de comparación múltiple de Tukey.

Descripción detallada de la invención

65 Definiciones

La presente invención proporciona roedores modificados genéticamente que expresan polipéptidos humanos o humanizados de MHC I y/u opcionalmente de $\beta 2$ microglobulina; métodos para producir los mismos; así como métodos de uso de los mismos. 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 I 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.

Por lo tanto, la invención también abarca un roedor modificado genéticamente cuyo genoma comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I y/o un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado, en donde los polipéptidos comprenden sustituciones de aminoácidos conservativas de las secuencias de aminoácidos descritas en la presente memoria.

Un experto en la técnica entenderá que además de los restos de ácido nucleico que codifican un polipéptido de MHC I y/o de $\beta 2$ microglobulina descritos en la presente memoria, debido a la degeneración del código genético, otros ácidos nucleicos pueden codificar los polipéptidos de la invención. Por lo tanto, además de un roedor modificado genéticamente que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica polipéptidos de MHC I y/o $\beta 2$ microglobulina con sustituciones de aminoácidos conservativas, también se proporciona 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 parte humana de la secuencia quimérica de humano/roedor (pero no la parte de roedor), se usa al efectuar 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 (p. ej., 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, p. ej., 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, p. ej., 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 (p. ej., secuencia promotora, potenciadora, silenciadora, etc.) con el fin de retener la regulación de la transcripción adecuada. Además, pueden unirse operativamente diversas porciones de la proteína quimérica o humanizada de la invención para mantener el plegamiento, procesamiento, direccionamiento, expresión y otras propiedades funcionales adecuadas de la proteína en la célula. Salvo que se indique lo contrario, los diversos dominios de las proteínas quiméricas o humanizadas de la invención están unidos operativamente entre sí.

El término “complejo MHC I” o similares, como se utiliza en la presente memoria, incluye el complejo entre el polipéptido de cadena α de MHC I y el polipéptido de β 2-microglobulina. El término “polipéptido de MHC I” o similares, como se utiliza en la presente memoria, incluye únicamente el polipéptido de la cadena α de MHC I. Normalmente, los términos “MHC humano” y “HLA” pueden usarse 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. Tal como se demuestra en los ejemplos más adelante, las secuencias de ácido nucleico de porciones codificantes de locus endógeno de los polipéptidos de MHC I y de β 2-microglobulina de ratón se reemplazaron por secuencias de nucleótidos que codifican porciones de polipéptidos de MHC I y β 2-microglobulina humana, respectivamente.

“Funcional” como se utiliza en la presente memoria, p. ej., 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 (p. ej., la sustitución en un locus endógeno de MHC I y/o β 2-microglobulina no humano) da como resultado un locus que no puede expresar un polipéptido endógeno funcional.

Varios aspectos descritos a continuación en la presente memoria para los roedores con MHC I modificado genéticamente, p. ej., tipo de animal; cepas del animal; tipos celulares; métodos de exploración, detección y otros; métodos de uso; etc., serán aplicables a los animales modificados genéticamente para β 2-microglobulina y para MHC I/ β 2-microglobulina.

Animales con el MHC I modificado genéticamente

En diversas realizaciones, la invención proporciona generalmente roedores modificados genéticamente que comprenden en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I humano o humanizado; por lo tanto, los roedores expresan un polipéptido de MHC I humano o humanizado.

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. Los genes del MHC se encuentran entre 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 de patógenos a linfocitos T citotóxicos.

La proteína del MHC de clase I comprende un dominio extracelular (que comprende tres dominios: α 1, α 2 y α 3), un dominio transmembrana y una cola citoplasmática. Los dominios α 1 y α 2 forman el surco de unión a péptidos, mientras que el α 3 interactúa con β 2-microglobulina.

Además de su interacción con β 2-microglobulina, el dominio α 3 interactúa con el co-receptor CD8 de TCR, facilitando la activación específica de antígeno. Aunque la unión de MHC de clase I a CD8 es aproximadamente 100 veces más débil que la unión de TCR a MHC de clase I, la unión de CD8 potencia la afinidad de la unión de TCR. Wooldridge y col. (2010) MHC Class I Molecules with Superenhanced CD8 Binding Properties Bypass the Requirement for Cognate TCR Recognition and Nonspecifically Activate CTLs, *J. Immunol.* 184:3357-3366. De manera interesante, la unión de MHC de clase I a CD8 suprimió la especificidad de antígeno en la activación de CTL. *Id.*

La unión de CD8 a moléculas de MHC de clase I es específica de especie; se demostró que el homólogo de CD8 de ratón, Lyt-2, se une a moléculas de H-2D^b en el dominio α 3, pero no se unió a moléculas de HLA-A. Connolly y col. (1988) The Lyt-2 Molecule Recognizes Residues in the Class I α 3 Domain in Allogeneic Cytotoxic T Cell Responses, *J. Exp. Med.* 168:325-341. La unión diferencial se debió probablemente a los determinantes similares a CDR (similares a CDR1 y CDR2) en CD8 que no están conservados entre humanos y ratones. Sanders y col. (1991) Mutations in CD8 that Affect Interactions with HLA Class I and Monoclonal Anti-CD8 Antibodies, *J. Exp. Med.* 174:371-379; Vitiello y col. (1991) Analysis of the HLA-restricted Influenza-specific Cytotoxic T Lymphocyte Response in Transgenic Mice Carrying a Chimeric Human-Mouse Class I Major Histocompatibility Complex, *J. Exp. Med.* 173:1007-1015; y Gao y col. (1997) Crystal structure of the complex between human CD8 $\alpha\alpha$ and HLA-A2, *Nature* 387:630-634. Se ha comunicado que CD8 se une a HLA-A2 en una región conservada del dominio α 3 (en la posición 223-229). Una sola sustitución (V245A) en HLA-A redujo la unión de CD8

a HLA-A, acompañada de una gran reducción en la lisis mediada por células T. Salter y col. (1989), Polymorphism in the $\alpha 3$ domain of HLA-A molecules affects binding to CD8, *Nature* 338:345-348. En general, el polimorfismo en el dominio $\alpha 3$ de las moléculas de HLA-A también afectó a la unión a CD8. *Id.* En ratones, la sustitución de aminoácidos en el resto 227 en H-2D^d afectó a la unión de Lyt-2 de ratón a H-2D^d y las células transfectadas con una H-2D^d mutante no fueron lisadas por linfocitos T CD8+. Potter y col. (1989) Substitution at residue 227 of H-2 class I molecules abrogates recognition by CD8-dependent, but not CD8-independent, cytotoxic T lymphocytes, *Nature* 337:73-75.

Por lo tanto, debido a la especificidad de especie de la interacción entre el dominio $\alpha 3$ de MHC de clase I y CD8, un complejo MHC I que comprendía un reemplazo de un dominio $\alpha 3$ de H-2K por un dominio $\alpha 3$ de HLA-A2 no era funcional en un ratón (es decir, *in vivo*) en ausencia de un CD8 humano. En animales transgénicos para HLA-A2, la sustitución del dominio $\alpha 3$ de ratón por el dominio $\alpha 3$ humano dio como resultado la restauración de la respuesta de linfocitos T. Irwin y col. (1989) Species-restricted interactions between CD8 and the $\alpha 3$ domain of class I influence the magnitude of the xenogeneic response, *J. Exp. Med.* 170:1091-1101; Vitiello y col. (1991), anteriormente citado.

El dominio transmembrana y la cola citoplasmática de las proteínas de MHC de clase I de ratón también tienen funciones importantes. Una función del dominio transmembrana de MHC I es facilitar la modulación mediante HLA-A2 de la adhesión de células homotípicas (potenciar o inhibir la adhesión), probablemente como resultado del sobrecruzamiento (o ligamiento) de moléculas de MHC de la superficie. Wagner y col. (1994) Ligation of MHC Class I and Class II Molecules Can Lead to Heterologous Desensitization of Signal Transduction Pathways That Regulate Homotypic Adhesion in Human Lymphocytes, *J. Immunol.* 152:5275-5287. La adhesión celular puede verse afectada por mAb que se unen a diversos epítomos de la molécula HLA-A2, lo que sugiere que existen múltiples sitios en HLA-A2 implicados en la modulación de la adhesión de células homotípicas; dependiendo del epítipo unido, el efecto puede ser la potenciación o la inhibición de la adhesión dependiente de HLA-A2. *Id.*

La cola citoplasmática codificada por los exones 6 y 7 del gen de MHC I es necesaria, según se ha comunicado, para su expresión adecuada en la superficie celular y para la inhibición mediada por LIR1 de la citotoxicidad de las células NK. Gruda y col. (2007) Intracellular Cysteine Residues in the Tail of MHC Class I Proteins Are Crucial for Extracellular Recognition by Leukocyte Ig-Like Receptor 1, *J. Immunol.* 179:3655-3661. Es necesaria una cola citoplasmática para la multimerización de al menos algunas moléculas de MHC I a través de la formación de enlaces disulfuro en sus restos de cisteína y, por lo tanto, pueden desempeñar un papel en su agrupación y en su reconocimiento por células NK. Lynch y col. (2009) Novel MHC Class I Structures on Exosomes, *J. Immunol.* 183:1884-1891.

El dominio citoplasmático de HLA-A2 contiene un resto de serina fosforilado de manera constitutiva y una tirosina fosforilable, aunque, en células Jurkat, las moléculas de HLA-A2 mutantes que carecen de un dominio citoplasmático parecen normales respecto de su expresión, asociación con el citoesqueleto, agregación e internalización endocítica. Gur y col. (1997) Structural Analysis of Class I MHC Molecules: The Cytoplasmic Domain Is Not Required for Cytoskeletal Association, Aggregation, and Internalization, *Mol. Immunol.* 34(2):125-132. Las moléculas de HLA-A2 que carecen del dominio citoplasmático se expresan de un modo aparentemente normal y se asocian con $\beta 2$ microglobulina. *Id.*

Sin embargo, varios estudios han demostrado que la cola citoplasmática es crucial en el tráfico intracelular, la presentación de antígenos mediada por células dendríticas (CD) y el cebado de CTL. Se demostró que es necesario un resto de tirosina codificado por el exón 6 para el tráfico de MHC I a través de los compartimentos endosómicos, la presentación de antígenos exógenos y el cebado de CTL; mientras que la eliminación del exón 7 provocó una potenciación de las respuestas antiviricas de los CTL. Lizée y col. (2003) Control of Dendritic Cross-Presentation by the Major Histocompatibility Complex Class I Cytoplasmic Domain, *Nature Immunol.* 4:1065-73; Basha y col. (2008) MHC Class I Endosomal and Lysosomal Trafficking Coincides with Exogenous Antigen Loading in Dendritic Cells, *PLoS ONE* 3: e3247; y Rodríguez-Cruz y col. (2011) Natural Splice Variant of MHC Class I Cytoplasmic Tail Enhances Dendritic Cell-Induced CD8+ T-Cell Responses and Boosts Anti-Tumor Immunity, *PLoS ONE* 6:e22939.

En diversas realizaciones, la invención proporciona un roedor (p. ej., ratón, rata) modificado genéticamente que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC de clase I humano o humanizado. El roedor comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I que es parcialmente humano y parcialmente no humano, p. ej., un roedor que expresa un polipéptido quimérico de MHC I de humano/roedor. En un aspecto, el roedor expresa únicamente el polipéptido de MHC I humano o humanizado, p. ej., el polipéptido quimérico de MHC I de humano/roedor y no expresa una proteína endógena MHC I de roedor a partir de un locus endógeno de MHC I.

En una realización, el polipéptido quimérico de MHC I de humano/roedor comprende en su parte humana un dominio de unión a péptido de un polipéptido de MHC I humano. La parte humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de un MHC I humano. La porción humana del polipéptido quimérico comprende los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un MHC I humano.

El polipéptido de MHC I humano o humanizado puede proceder de una molécula de HLA humana funcional codificada por un locus de HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F o HLA-G. Se describe una lista de antígenos HLA comúnmente usados 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. Por lo tanto, el polipéptido de MHC I humano o humanizado puede obtenerse de cualquier molécula de HLA de clase I humana funcional descrita en la misma.

En un aspecto específico, el polipéptido de MHC I humano o humanizado procede de HLA-A humano. En una realización específica, el polipéptido HLA-A es un polipéptido HLA-A2 (p. ej., un polipéptido HLA-A2.1). En una realización, el polipéptido HLA-A es un polipéptido codificado por un alelo HLA-A*0201, p. ej., el alelo HLA-A*02:01:01:01. El alelo HLA-A*0201 se usa comúnmente entre la población de Norteamérica. Aunque los presentes ejemplos describen esta secuencia de HLA concreta, cualquier secuencia de HLA-A adecuada está abarcada en la presente memoria, p. ej., variantes polimórficas de HLA-A2 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 la secuencia descrita en la presente memoria debido a la degeneración del código genético, etc.

En un aspecto, se proporciona un roedor que expresa una secuencia de HLA-A2 humana, en donde la secuencia de HLA-A2 humana comprende una o más modificaciones conservativas o no conservativas.

En un aspecto, se proporciona un roedor que expresa una secuencia de HLA-A2 humana, en donde la secuencia de HLA-A2 humana es al menos aproximadamente 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de HLA-A2 humana. En una realización específica, la secuencia de HLA-A2 humana es al menos aproximadamente 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de HLA-A2 humana descrita en los ejemplos. En una realización, la secuencia de HLA-A2 humana comprende una o más sustituciones conservativas. En una realización, la secuencia de HLA-A2 humana comprende una o más sustituciones no conservativas.

En otro aspecto específico, el polipéptido de MHC I humano o humanizado procede de un MHC I humano seleccionado de HLA-B y HLA-C. En un aspecto, el MHC I humano o humanizado procede de HLA-B, p. ej., HLA-B27.

La porción de roedor del polipéptido quimérico de MHC I de humano/roedor comprende dominios transmembrana y/o citoplasmáticos del polipéptido de MHC I de roedor. En una realización, el roedor es un ratón y el polipéptido de MHC I de roedor se selecciona de H-2K, H-2D y H-2L. En una realización, el polipéptido de MHC I de roedor es H-2K, p. ej., H-2Kb. Aunque en los ejemplos se describen secuencias de H-2K específicas, cualquier secuencia adecuada de H-2K, p. ej., variantes polimórficas, sustituciones conservativas/no conservativas de aminoácidos, etc. están abarcadas en la presente memoria.

El roedor descrito en la presente memoria comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I humano o humanizado, p. ej., un polipéptido quimérico de MHC I de humano/roedor, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica dicho polipéptido está ubicada en un locus endógeno de MHC I de roedor (p. ej., locus de H-2K). En un aspecto, esto da como resultado la sustitución de un gen de MHC I endógeno o de una porción del mismo por una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I humano o humanizado, p. ej., un gen quimérico que codifica un polipéptido quimérico de MHC I de humano/roedor descrito en la presente memoria. En una realización, el reemplazo comprende un reemplazo de una secuencia de nucleótidos endógena que codifica un dominio de unión a péptido de MHC I de roedor o un dominio extracelular de MHC I de roedor por una secuencia de nucleótidos humana (p. ej., la secuencia de nucleótido de HLA-A2) que codifica al mismo. En esta realización, el reemplazo no comprende un reemplazo de una secuencia que codifica los dominios transmembrana y/o citoplasmáticos de MHC I de un polipéptido de MHC I de roedor (p. ej., el polipéptido H-2K). Por lo tanto, el roedor contiene una secuencia de nucleótidos quimérica de humano/roedor en un locus endógeno de MHC I de roedor y expresa el polipéptido quimérico de MHC de humano/roedor a partir del locus endógeno de MHC I de roedor.

Un polipéptido quimérico de humano/roedor puede ser de tal manera que comprenda una secuencia líder (señal) humana o de roedor. En una realización, el polipéptido quimérico comprende una secuencia líder de roedor de una proteína del MHC I endógena. En otra realización, el polipéptido quimérico comprende una secuencia líder de una proteína del MHC I humana, p. ej., la proteína HLA-A2 (por ejemplo, la secuencia líder de HLA-A2.1). Por lo tanto, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido quimérico de MHC I puede unirse operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder de MHC I humana.

Un polipéptido quimérico de MHC I de humano/roedor puede comprender en su parte humana un dominio extracelular completo o sustancialmente completo de un polipéptido de MHC I humano. Por lo tanto, la parte humana puede comprender al menos 80 %, preferiblemente al menos 85 %, más preferiblemente al menos 90 %, de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de MHC I humano.

p. ej., 95 % o más de los aminoácidos que codifican un dominio extracelular de un polipéptido de MHC I humano (p. ej., el polipéptido HLA-A2). En un ejemplo, el dominio extracelular sustancialmente completo del polipéptido de MHC I humano carece de una secuencia líder de MHC I humano. En otro ejemplo, el polipéptido quimérico de MHC I de humano/no humano comprende una secuencia líder de MHC I humano.

5 Además, el polipéptido quimérico de MHC I puede expresarse bajo el control de elementos reguladores endógenos de roedor. Dicha disposición facilitará la expresión adecuada del polipéptido quimérico de MHC I en el roedor, p. ej., durante la respuesta inmunológica en el roedor.

10 El animal modificado genéticamente es un roedor. En una realización, el roedor se selecciona de 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 de Calomyscidae (p. ej., hámsteres similares a ratones), Cricetidae (p. ej., 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 (p. ej., lirón espinoso de Malabar) y Spalacidae (p. ej., ratas topo, ratas de bambú y zocos). En una realización específica, el roedor genéticamente modificado se selecciona de 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 de un ratón y una rata. En una realización, el roedor es un ratón.

20 En una realización específica, el roedor es un ratón de una cepa de C57BL seleccionada de 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 del grupo que consiste en una cepa que es 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (p. ej., 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (véase, p. ej., 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, p. ej., una cepa BALB/c. En otra realización más, el ratón es una mezcla de una cepa BALB y otra cepa anteriormente mencionada.

35 En una realización, el roedor es una rata. En una realización, la rata se selecciona de 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.

40 Por lo tanto, en una realización, la invención se refiere a un ratón modificado genéticamente que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico de MHC I de humano/ratón, en donde una parte humana del polipéptido quimérico comprende un dominio de unión a péptidos o un dominio extracelular de un MHC I humano (p. ej., HLA-A humano, p. ej., HLA-A2 humano, p. ej., HLA-A2.1 humano). En algunas realizaciones, el ratón no expresa un dominio de unión a péptidos o extracelular de un polipéptido endógeno de ratón a partir de su locus endógeno de ratón. El dominio de unión a péptidos del MHC I humano puede comprender los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$. En un aspecto, el dominio extracelular del MHC I humano comprende un dominio extracelular de una cadena α de MHC I humano. En una realización, el locus endógeno de ratón es un locus de H-2K (p. ej., H-2Kb) y la parte de ratón del polipéptido quimérico comprende los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido H-2K (p. ej., H-2Kb) de ratón.

50 Por lo tanto, en una realización, se proporciona un ratón modificado genéticamente, en donde el ratón comprende en un locus endógeno de H-2K (p. ej., H-2Kb) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico de MHC I de humano/ratón, en donde una parte humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido HLA-A2 (HLA-A2.1) humano y una parte de ratón comprende los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido H-2K (p. ej., H-2Kb) de ratón. En un aspecto, el ratón no expresa un dominio extracelular del polipéptido H-2K (p. ej., H-2Kb) de ratón a partir de un locus endógeno de MHC I. En una realización, el ratón expresa un polipéptido quimérico HLA-A2/H-2K (p. ej., un HLA-A2.1/H-2Kb quimérico) a partir de un locus endógeno de H-2K (p. ej., H-2Kb). En diversas realizaciones, la expresión del gen quimérico se encuentra bajo el control de elementos reguladores endógenos de MHC de clase I de ratón. En algunos aspectos, el ratón comprende dos copias del locus quimérico de MHC I que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido HLA-A2/H-2K quimérico; mientras que en otros aspectos, el ratón comprende una copia del locus quimérico de MHC I que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido HLA-A2/H-2K quimérico. Por lo tanto, el ratón puede ser homocigoto o heterocigoto para la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido HLA-A2/H-2K quimérico.

65 En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, se proporciona un ratón que comprende un locus quimérico de MHC I ubicado en un locus de H-2K endógeno de ratón. El locus quimérico comprende una secuencia de nucleótidos que

codifica los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un gen de HLA-A2 humano. El locus quimérico carece de una secuencia de nucleótidos que codifique un dominio extracelular de una proteína H-2K de ratón (p. ej., los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de la H-2K de ratón). En un aspecto, el locus quimérico carece de una secuencia de nucleótidos que codifique un péptido líder y los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una H-2K de ratón; y comprende un péptido líder, los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una HLA-A2 humana y los dominios transmembrana y citoplasmáticos de una H-2K de ratón. Los diversos dominios del locus quimérico se unen operativamente entre sí de tal forma que el locus quimérico expresa una proteína quimérica MHC I de humano/ratón funcional.

En diversas realizaciones, un roedor (p. ej., un ratón o rata), que expresa una proteína del MHC I quimérica funcional procedente de un locus de MHC I quimérico como se describe en la presente memoria, presenta la proteína quimérica sobre una superficie celular. En una realización, el roedor expresa la proteína del MHC I 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 (un fragmento de antígeno) unido a una parte extracelular (p. ej., la parte extracelular de HLA-A2 humana) de la proteína del MHC I quimérica. En una realización, la parte extracelular de dicha proteína quimérica interactúa con otras proteínas sobre la superficie de dicha célula, p. ej., $\beta 2$ -microglobulina.

En diversas realizaciones, una célula que presenta la proteína del MHC I quimérica, p. ej., la proteína HLA-A2/H-2K, es una célula nucleada. En diversos aspectos, la célula es una célula presentadora de antígenos (APC). Aunque la mayoría de las células en el organismo pueden presentar un antígeno en el contexto del MHC I, algunos ejemplos no limitantes de células presentadoras de antígenos incluyen macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. Se conocen en la técnica otras células presentadoras de antígeno, incluidas APC profesionales y no profesionales y se encuentran abarcadas en la presente memoria. En algunas realizaciones, la célula que presenta la proteína del MHC I quimérica es una célula tumoral y un fragmento de péptido presentado por la proteína quimérica procede de un tumor. En otras realizaciones, el fragmento de péptido presentado por la proteína del MHC I quimérica procede de un patógeno, p. ej., una bacteria o un virus.

La proteína del MHC I quimérica descrita en la presente memoria puede interactuar con otras proteínas sobre la superficie de la misma célula o de una segunda célula. En algunas realizaciones, la proteína del MHC I quimérica interactúa con proteínas endógenas no humanas sobre la superficie de dicha célula. La proteína del MHC I quimérica también puede interactuar con proteínas humanas o humanizadas sobre la superficie de la misma célula o de una segunda célula.

Sobre la misma célula, las moléculas de HLA de clase I pueden interactuar funcionalmente con $\beta 2$ -microglobulina tanto no humana (p. ej., de roedor, p. ej., de ratón o rata) como humana. Por lo tanto, en una realización, la proteína del MHC I quimérica, p. ej., la proteína HLA-A2/H-2K, interactúa con una $\beta 2$ -microglobulina de ratón. Aunque es posible la interacción entre algunas moléculas de HLA de clase I humanas y $\beta 2$ -microglobulina de ratón, sin embargo, esta puede reducirse en gran medida en comparación con la interacción entre HLA de clase I humana y $\beta 2$ -microglobulina humana. Por lo tanto, en ausencia de $\beta 2$ -microglobulina humana, puede reducirse la expresión del MHC I humano sobre la superficie celular. Perarnau y col. (1988) Human $\beta 2$ -microglobulin Specifically Enhances Cell-Surface Expression of HLA Class I Molecules in Transfected Murine Cells, *J. Immunol.* 141:1383-89. Otras moléculas de HLA, p. ej., HLA-B27, no interactúan con $\beta 2$ -microglobulina de ratón; véase, p. ej., Tishon y col. (2000) Transgenic Mice Expressing Human HLA and CD8 Molecules Generate HLA-Restricted Measles Virus Cytotoxic T Lymphocytes of the Same Specificity as Humans with Natural Measles Virus Infection, *Virology* 275:286-293, que comunica que la función de HLA-B27 en ratones transgénicos necesita tanto $\beta 2$ -microglobulina humana como CD8 humano. Por lo tanto, en otra realización, la proteína del MHC I quimérica interactúa con una $\beta 2$ -microglobulina humana o humanizada. En algunas realizaciones similares, como se describen más adelante en la presente memoria, el roedor (p. ej., un ratón o una rata) comprende en su genoma un gen de $\beta 2$ -microglobulina humano o humanizado y el animal expresa un polipéptido de $\beta 2$ -microglobulina humano o humanizado funcional; por lo tanto, la proteína quimérica del MHC I interactúa con un polipéptido de $\beta 2$ -microglobulina humano o humanizado.

En diversos aspectos, la proteína quimérica (p. ej., la proteína HLA-A2/H-2K) también interactúa con proteínas sobre la superficie de una segunda célula (a través de su parte extracelular). La segunda célula puede ser una célula de un roedor, p. ej., un ratón, o de origen humano. La segunda célula puede proceder del mismo roedor o del mismo roedor que la célula que expresa el polipéptido quimérico de MHC I. Los ejemplos no limitantes de proteínas con las que puede interactuar la parte extracelular de una proteína quimérica (p. ej., HLA-A2/H-2K) incluyen el receptor de linfocitos T (TCR) y su co-receptor, CD8. Por lo tanto, una segunda célula puede ser un linfocito T. Además, la parte extracelular de la proteína quimérica del MHC I puede unirse a una proteína sobre la superficie de linfocitos citolíticos naturales (NK), p. ej., receptores de tipo inmunoglobulina en linfocitos citolíticos (KIR) sobre la superficie de células NK.

Un linfocito T o una célula NK puede unirse a un complejo formado entre el polipéptido quimérico de MHC I y su fragmento de péptido presentado. Dicha unión puede dar como resultado la activación de linfocitos T o la inhibición de la eliminación celular mediada por NK, respectivamente. Una hipótesis es que las células NK han evolucionado para eliminar a células tanto infectadas como tumorales que se han escapado de la citotoxicidad mediada por linfocitos T regulando negativamente su complejo MHC I. Sin embargo, cuando se expresa el complejo MHC I sobre la superficie celular, los receptores de células NK lo reconocen y se inhibe la eliminación celular mediada por NK. Por lo tanto, en algunos

aspectos, cuando se une una célula NK a un complejo formado entre el polipéptido quimérico de MHC I (p. ej., el polipéptido HLA-A2/H-2K) y un fragmento de péptido presentado sobre la superficie de una célula tumoral o infectada, se inhibe la eliminación celular mediada por NK.

5 En un ejemplo, el polipéptido quimérico de MHC I descrito en la presente memoria, p. ej., un polipéptido quimérico HLA-A2/H-2K, interactúa con la proteína CD8 sobre la superficie de una segunda célula. En una realización, el polipéptido quimérico HLA-A2/H-2K interactúa con la proteína CD8 endógena de roedor (p. ej., de ratón o rata) sobre la superficie de una segunda célula. En una realización, la segunda célula es un linfocito T. En otra
10 realización, la segunda célula se modifica por ingeniería genética para que exprese CD8. En determinados aspectos, el polipéptido quimérico HLA-A2/H-2K interactúa con una CD8 humana sobre la superficie de la segunda célula (p. ej., una célula humana o una célula de roedor). En algunas de dichas realizaciones, el roedor, p. ej., un ratón o una rata, comprende un transgén de CD8 humano y el ratón o la rata expresa una proteína CD8 humana funcional.

15 El polipéptido quimérico de MHC I descrito en la presente memoria también puede interactuar con un TCR no humano (p. ej., de ratón o rata), un TCR humano o un TCR humanizado en una segunda célula. El polipéptido quimérico de MHC I puede interactuar con un TCR endógeno (p. ej., TCR de ratón o rata) en la superficie de una segunda célula. El polipéptido quimérico de MHC I también puede interactuar con un TCR humano o humanizado expresado en la superficie de una segunda célula, en donde la célula procede del mismo animal o especie de
20 animal (p. ej., ratón o rata) que la célula que expresa el polipéptido quimérico de MHC I. El polipéptido quimérico de MHC I puede interactuar con un TCR humano expresado sobre la superficie de una célula humana.

En la presente memoria también se describe un tejido, en donde el tejido procede de un animal no humano (p. ej., un ratón o una rata) como se describe en la presente memoria y expresa el polipéptido quimérico de MHC I (p. ej.,
25 el polipéptido HLA-A2/H-2K).

En la presente memoria se describe una célula no humana aislada de un animal no humano como se describe en la presente memoria. En una realización, la célula es una célula ES. En una realización, la célula es una célula presentadora de antígenos, p. ej., una célula dendrítica, macrófago, linfocito B. En una realización, la célula es una
30 célula inmunológica. En una realización, la célula inmunológica es un linfocito.

En la presente memoria se describe una célula no humana que comprende un cromosoma o un fragmento del mismo de un animal no humano como se describe en la presente memoria. En una realización, la célula no humana comprende un núcleo de un animal no humano, como se describe en la presente memoria. En una realización, la
35 célula no humana comprende el cromosoma o el fragmento del mismo como resultado de una transferencia nuclear.

En la presente memoria se describe una célula pluripotente inducida no humana que comprende un gen que codifica un polipéptido quimérico de MHC I (p. ej., el polipéptido HLA-A2/H-2K) como se describe en la presente memoria. En una
40 realización, la célula pluripotente inducida procede de un animal no humano como se describe en la presente memoria.

En la presente memoria se describe un hibridoma o un cuadroma, procedente de una célula de un animal no humano, como se describe en la presente memoria. En una realización, el animal no humano es un ratón o una rata.

También se proporciona un método para producir un roedor modificado genéticamente, p. ej., un ratón o una rata
45 descritos en la presente memoria. El método para producir un animal no humano modificado genéticamente da como resultado un animal cuyo genoma comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico de MHC I. En una realización, el método da como resultado un ratón modificado genéticamente, cuyo genoma comprende en un locus de MHC I endógeno, p. ej., el locus de H-2K, una secuencia de nucleótidos que
50 codifica un polipéptido quimérico de MHC I de humano/ratón, en donde una parte humana del polipéptido quimérico de MHC I comprende un dominio extracelular de una HLA-A2 humana y una parte de ratón comprende los dominios transmembrana y citoplasmáticos de una H-2K 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
55 cepas 129 y C57BL/6 de ratón; en otra realización, las células ES son una mezcla de las cepas BALB/c y 129 de ratón.

En la presente memoria se describe una construcción de nucleótidos usada para generar animales no humanos modificados genéticamente descritos en la presente memoria. En un aspecto, la construcción de nucleótidos
60 comprende: brazos de homología 5' y 3' no humanos, un fragmento de ADN humano que comprende las secuencias génicas de HLA-A humanas y un casete de selección flanqueado por sitios de recombinación. En una realización, el fragmento de ADN humano es un fragmento genómico que comprende tanto intrones como exones de un gen de HLA-A humano. En una realización, los brazos de homología no humanos son homólogos a un locus de MHC de clase I no humano (p. ej., un locus de H-2K de ratón).

65

En una realización, el fragmento genómico comprende secuencias codificantes de líder de HLA-A humano, un dominio $\alpha 1$, un dominio $\alpha 2$ y un dominio $\alpha 3$. En una realización, el fragmento de ADN humano comprende, de 5' a 3': una secuencia líder de HLA-A, un líder de HLA-A/intrón $\alpha 1$, un exón de $\alpha 1$ de HLA-A, un intrón de $\alpha 1$ - $\alpha 2$ de HLA-A, un exón de $\alpha 2$ de HLA-A, un intrón de $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de HLA-A y un exón de $\alpha 3$ de HLA-A.

5 Un casete de selección es una secuencia de nucleótidos insertada en una construcción directora para facilitar la selección de las células (p. ej., 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 (p. ej., Neo, Hyg, Pur, CM, Spec, etc.). Además, un casete de selección
10 puede estar flanqueado por sitios de recombinación, que permiten la deleción 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.

15 En una realización, el casete de selección se ubica en el extremo 5' del fragmento de ADN humano. En otra realización, el casete de selección se ubica en el extremo 3' del fragmento de ADN humano. En otra realización, el casete de selección se ubica dentro del fragmento de ADN humano. En otra realización, el casete de selección se ubica dentro de un intrón del fragmento de ADN humano. En otra realización, el casete de selección se ubica dentro del intrón $\alpha 2$ - $\alpha 3$.

20 En una realización, los brazos de homología 5' y 3' no humanos comprenden secuencia genómica en ubicaciones en 5' y 3' de un locus del gen de MHC de clase I endógeno no humano (p. ej., murino), respectivamente (p. ej., 5' de la primera secuencia líder y 3' del exón $\alpha 3$ del gen de MHC I no humano). En una realización, el locus de MHC de clase I endógeno se selecciona de H-2K, H-2D y H-2L de ratón. En una realización específica, el locus endógeno de MHC de clase I es H-2K de ratón.

25 En la presente memoria se describe una construcción de nucleótido que comprende, de 5' a 3': un brazo de homología 5' que contiene secuencia genómica de ratón 5' del locus endógeno de ratón de H-2K, un primer fragmento de ADN humano que comprende una primera secuencia genómica de un gen de HLA-A, un sitio de secuencia de recombinación 5' (p. ej., *loxP*), un casete de selección, un sitio de secuencia de recombinación 3' (p. ej., *loxP*), un
30 segundo fragmento de ADN humano que comprende una segunda secuencia genómica de un gen de HLA-A y un brazo de homología 3' que contiene secuencia genómica de ratón 3' de un exón $\alpha 3$ de H-2K endógeno. En una realización, la construcción de nucleótidos comprende, de 5' a 3': un brazo de homología 5' que contiene secuencia genómica de ratón 5' del locus endógeno de ratón de H-2K, una secuencia genómica humana que incluye un líder de HLA-A, una secuencia de líder de HLA-A/intrón $\alpha 1$, un exón $\alpha 1$ de HLA-A, un intrón $\alpha 1$ - $\alpha 2$ de HLA-A, un exón $\alpha 2$ de HLA-A, una primera parte 5' de un intrón $\alpha 2$ - $\alpha 3$, un casete de selección flanqueado por sitios de recombinación, una
35 segunda parte 3' de un intrón $\alpha 2$ - $\alpha 3$, un exón $\alpha 3$ de HLA-A y un brazo de homología 3' que contiene secuencia genómica no de ratón 3' del exón $\alpha 3$ de H-2K endógeno de ratón. En una realización, se expone una secuencia de brazo de homología 5' en la Id. de sec. n.º 1 y se expone una secuencia de brazo de homología 3' en la Id. de sec. n.º 2.

40 Tras completar el direccionamiento del gen, las células ES o los animales no humanos modificados genéticamente se exploran para confirmar la incorporación correcta de la secuencia de nucleótidos exógena de interés o la expresión del polipéptido exógeno. Los expertos en la técnica conocen numerosas técnicas que incluyen (aunque no de forma limitativa) la transferencia Southern, la PCR larga, la PCT cuantitativa (p. ej., la PCR en tiempo real usando TAQMAN®), la hibridación mediante fluorescencia *in situ*, la transferencia Northern, citometría de flujo, análisis por transferencia de Western, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, etc. En un
45 ejemplo, los animales no humanos (p. ej., 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
50 animales modificados genéticamente.

La descripción también proporciona un método para modificar un locus de MHC I de un animal no humano para que exprese un polipéptido quimérico de MHC I de humano/no humano descrito en la presente memoria. En la presente
55 memoria se describe un método para modificar un locus de MHC I de un ratón para que exprese un polipéptido quimérico de MHC I de humano/ratón, en donde el método comprende reemplazar en un locus endógeno de MHC I una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de unión a péptidos de un polipéptido de MHC I de ratón por una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de unión a péptidos de un polipéptido de MHC I humano. En algunos aspectos, se reemplaza una secuencia de nucleótidos de un dominio extracelular de un MHC I de ratón por una secuencia de
60 nucleótidos de un dominio extracelular de un MHC I humano. El ratón puede no lograr expresar el dominio de unión a péptidos o extracelular del MHC I de ratón a partir de un locus endógeno de MHC I. En algunas realizaciones, se reemplaza una secuencia de nucleótidos de un dominio extracelular de una H-2K de ratón por una secuencia de nucleótidos de un dominio extracelular de una HLA-A2 humana, de tal forma que el locus de MHC I de ratón modificado expresa un polipéptido quimérico HLA-A2/H-2K.

65

5 En la presente memoria se proporciona un método para producir una molécula quimérica de HLA de clase I humana/MHC de clase I no humano que comprende expresar en una sola célula una proteína quimérica HLA-A/H-2K a partir de una construcción de nucleótidos, en donde la construcción de nucleótidos comprende una secuencia de ADNc que codifica un dominio $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una proteína HLA-A y un dominio transmembrana y uno citoplasmático de una proteína H-2K no humana, p. ej., la proteína H-2K de ratón. En una realización, la construcción de nucleótidos es un vector vírico; en una realización específica, el vector vírico es un vector lentivírico. En una realización, la célula se selecciona de una célula CHO, COS, 293, HeLa y una retinal que expresa una secuencia de ácido nucleico vírica (p. ej., una célula PERC.6™).

10 En la presente memoria se proporciona una célula que expresa una proteína quimérica de HLA de clase I humana/MHC I no humano (p. ej., la proteína HLA-A/H-2K). En una realización, la célula comprende un vector de expresión que comprende un gen de MHC de clase I quimérico, en donde el gen de MHC de clase I quimérico comprende una secuencia de un gen de HLA-A humano fusionado en unión operativa a una secuencia de un gen de H-2K no humano, p. ej., el gen de H-2K de ratón. En una realización, la secuencia del gen de HLA-A humano comprende los exones que codifican los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una proteína HLA-A. En una realización, la secuencia del gen de H-2K no humano comprende los exones que codifican los dominios transmembrana y citoplasmáticos de una proteína H-2K. En una realización, la célula se selecciona de una célula CHO, COS, 293, HeLa y una retinal que expresa una secuencia de ácido nucleico vírica (p. ej., una célula PERC.6™).

20 En la presente memoria también se proporciona una molécula quimérica de MHC de clase I producida por un animal no humano como se describe en la presente memoria, en donde la molécula quimérica de MHC de clase I comprende los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una proteína HLA-A humana y los dominios transmembrana y citoplasmáticos de una proteína H-2K no humana, p. ej., de ratón. El polipéptido quimérico de MHC I descrito en la presente memoria puede detectarse mediante anticuerpos anti-HLA-A. Por lo tanto, puede detectarse y/o seleccionarse una célula que presente el polipéptido quimérico de MHC I de humano/no humano usando anticuerpos anti-HLA-A. En algunos casos, el polipéptido quimérico de MHC I descrito en la presente memoria puede detectarse mediante un anticuerpo anti-HLA-A2.

30 Aunque los ejemplos adjuntos describen un animal modificado genéticamente cuyo genoma comprende un reemplazo de una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de un polipéptido H-2K de ratón por la secuencia que codifica un dominio extracelular de una HLA-A humana en el locus endógeno de H-2K de ratón, un experto en la técnica podría entender que podría usarse una estrategia similar para reemplazar otros locus de MHC I de ratón (H-2D, H-2L, etc.) por sus locus de HLA humanos correspondientes (HLA-B, HLA-C, etc.). Por lo tanto, también se proporciona un animal no humano que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico de MHC I de humano/no humano, en donde una porción humana del polipéptido procede de otra proteína de HLA de clase I. También se contempla el reemplazo de múltiples locus de MHC I.

Animales modificados genéticamente para $\beta 2$ microglobulina

40 En la presente memoria se describen animales no humanos modificados genéticamente que comprenden en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado; por lo tanto, los animales expresan un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado.

45 La $\beta 2$ microglobulina o la cadena ligera del complejo MHC de clase I (también abreviada como “ $\beta 2M$ ”) es una proteína pequeña (12 kDa) no glucosilada cuya función principal es estabilizar la cadena α del MHC I. El gen de $\beta 2$ microglobulina humano codifica una proteína de 119 aminoácidos, con 20 aminoácidos N-terminales que codifican una secuencia líder. La proteína madura comprende 99 aminoácidos. El gen contiene 4 exones, conteniendo el primer exón la región 5' no traducida, la secuencia líder completa y los dos primeros aminoácidos del polipéptido maduro; el segundo exón codifica la mayoría de la proteína madura; el tercer exón codifica los cuatro últimos aminoácidos de la proteína madura y un codón de parada; y el cuarto exón contiene la región 3' no traducida. Gussow y col. (1987) The $\beta 2$ -Microglobulin Gene. Primary Structure and Definition of the Transcriptional Unit, J. Immunol. 139:3131-38. La $\beta 2$ microglobulina se asocia de manera no covalente con el MHC I. La $\beta 2$ microglobulina no unida se encuentra en fluidos corporales, tales como plasma y se transporta hasta el riñón para su excreción. La disfunción renal provoca la acumulación de $\beta 2$ microglobulina, que puede ser patógena (p. ej., amiloidosis relacionada con la diálisis); la proteína acumulada forma fibrillas filamentosas que se asemejan a las placas de amiloide en las articulaciones y los tejidos conectivos.

60 Además de la amiloidosis relacionada con la diálisis, se ha relacionado la $\beta 2$ microglobulina con una serie de trastornos diferentes. Se detectaron niveles elevados de $\beta 2$ microglobulina en neoplasias malignas linfocíticas, p. ej., linfoma no Hodgkin y mieloma múltiple. Véase, p. ej., Shi y col. (2009) $\beta 2$ Microglobulin: Emerging as a Promising Cancer Therapeutic Target, Drug Discovery Today 14:25-30. Otras neoplasias malignas con niveles elevados de $\beta 2$ microglobulina incluyen cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer renal y cánceres gastrointestinales y nasofaríngeos. Se ha sugerido que la sobreexpresión de $\beta 2$ microglobulina tiene efectos promotores del crecimiento tumoral. *Id.* También se ha demostrado recientemente que la $\beta 2$ microglobulina dirige la transición de epitelial a mesenquimal, promoviendo las metástasis al hueso y a tejidos blandos en los cánceres de mama, próstata, pulmón y renales. Jossion y col. (2011) $\beta 2$ microglobulin Induces Epithelial to Mesenchymal Transition

and Confers Cancer Lethality and Bone Metastasis in Human Cancer Cells. *Cancer Res.* 71(7): 1-11. La $\beta 2$ microglobulina interactúa con un miembro no clásico de MHC I, la proteína de la hemocromatosis (HFE) y con el receptor de transferrina y modula la homeostasia del hierro. *Id.* La implicación de la $\beta 2$ microglobulina en otras marcas distintivas de neoplasias malignas (auto-renovación, potenciación de la angiogénesis, resistencia al tratamiento) se ha documentado ampliamente en la técnica.

Se ha informado de ratones deficientes para $\beta 2$ microglobulina. Véase Koller y col. (1990) Normal development of mice deficient in $\beta 2m$, MHC class I proteins, and CD8+ T cells, *Science* 248: 1227-1230. Tal como se informa en Koller y col., estos ratones parecían sanos, aunque no se detectó expresión de MHC de clase I. Además, la mayoría de las poblaciones de linfocitos T parecían normales en algunos tejidos, mientras que en otros se observó una reducción notable de linfocitos T CD8+. Esta supuesta falta de expresión de MHC I contrasta con los resultados previos obtenidos por Allen y col. ((1986) $\beta 2$ microglobulin Is Not Required for Cell Surface Expression of the Murine Class I Histocompatibility Antigen H-2D^b or of a Truncated H-2D^b, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7447-7451). Allen y col. comunicaron que la $\beta 2$ microglobulina no era absolutamente necesaria para la expresión en la superficie celular de todos los complejos de MHC I ya que las células que carecían de $\beta 2$ microglobulina eran capaces de expresar H-2D^b. Sin embargo, la función de H-2D^b en estas células estaba probablemente comprometida y la conformación de H-2D^b era diferente a la de la proteína nativa, lo que explica la incapacidad de Koller y colaboradores para detectar esta proteína usando anticuerpos contra H-2D^b nativa. Sin embargo, las células que carecen de $\beta 2$ microglobulina, según se ha comunicado, pueden presentar antígeno endógeno a linfocitos T CD8+ (incluidos linfocitos T CD8+ exógenos de ratones normales) y, según se ha comunicado, la $\beta 2$ microglobulina no es necesaria para desarrollar altos niveles de TCL CD8+ restringidos a H-2^d de MHC de clase I en respuesta a la exposición a antígenos en ratones, aunque es necesaria para mantener una respuesta inmunológica eficaz. Quinn y col. (1997) Virus-Specific, CD8+ Major Histocompatibility Complex Class I-Restricted Cytotoxic T Lymphocytes in Lymphocytic Choriomeningitis Virus-Infected $\beta 2$ -Microglobulin-Deficient Mice, *J. Virol.* 71:8392-8396. Cabe destacar que la capacidad para generar altos niveles de dichos linfocitos T en ausencia de $\beta 2$ microglobulina está, según se ha comunicado, limitada a una respuesta restringida a H-2^d de MHC de clase I. Se ha comunicado que los ratones deficientes para $\beta 2$ microglobulina tienen una serie de características dramáticas, tales como, por ejemplo, una susceptibilidad aumentada a determinadas enfermedades parasitarias, una susceptibilidad aumentada a infecciones causantes de hepatitis, una deficiencia en el metabolismo del hierro y un fenotipo de cría alterado. Cooper y col. (2007) An impaired breeding phenotype in mice with a genetic deletion of Beta-2 microglobulin and diminished MHC class I expression: Role in reproductive fitness, *Biol. Reprod.* 77:274-279.

Se ha informado de ratones que expresan $\beta 2$ microglobulina humana además de moléculas de HLA de clase I humanas (es decir, HLA-B7) en un transgén insertado aleatoriamente. Chamberlain y col. (1988) Tissue-specific and cell surface expression of human major histocompatibility complex class I heavy (HLA-B7) and light ($\beta 2$ -microglobulin) chain genes in transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7690-7694. La expresión de HLA de clase I humana era coherente con la de la clase I endógena, con una reducción notable en el hígado. *Id.* La expresión de $\beta 2$ microglobulina humana también era coherente con la $\beta 2$ microglobulina endógena, aunque la expresión de la molécula de HLA de clase I humana se aumentó de 10 a 17 veces en ratones dobles transgénicos. *Id.* Sin embargo, los autores no probaron el reemplazo de un locus de $\beta 2$ microglobulina endógeno de ratón por un locus de $\beta 2$ microglobulina humano.

Por lo tanto, en la presente memoria se describe un animal no humano (p. ej., un roedor, p. ej., un ratón o una rata) modificado genéticamente cuyo genoma comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado. En un aspecto, el animal no expresa una $\beta 2$ microglobulina no humana endógena a partir de un locus endógeno de $\beta 2$ microglobulina no humano. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina que es parcialmente humano y parcialmente no humano, p. ej., contiene algunos aminoácidos que corresponden a $\beta 2$ microglobulina humana y algunos aminoácidos que corresponden a la no humana. En un aspecto, el animal no humano no expresa un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina no humano endógeno a partir de un locus no humano endógeno y únicamente expresa el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado. En un ejemplo, el animal no humano no expresa un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina no humano endógeno completo, sino que expresa únicamente una porción de un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina endógeno no humano a partir de un locus de $\beta 2$ microglobulina endógeno. Por lo tanto, en diversas realizaciones, el animal no expresa un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina no humano funcional a partir de un locus de $\beta 2$ microglobulina no humano endógeno. En un aspecto específico, la secuencia de nucleótidos que codifica la $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada se ubica en un locus de $\beta 2$ microglobulina no humana endógeno. En un aspecto, el animal comprende dos copias del locus de $\beta 2$ microglobulina que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado. En otro aspecto, el animal comprende una copia del locus de $\beta 2$ microglobulina que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado. Por lo tanto, el animal puede ser homocigoto o heterocigoto para el locus de $\beta 2$ microglobulina que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado. La secuencia de nucleótidos de la $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada puede proceder de una colección de secuencias de $\beta 2$ microglobulina que se encuentran de manera natural en poblaciones humanas. En diversas realizaciones, el animal no humano modificado genéticamente de la invención comprende en su línea germinal una secuencia de nucleótidos que codifica $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. En una realización, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina

humano o humanizado comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de $\beta 2$ microglobulina humana. En una realización, el polipéptido es capaz de unirse a una proteína de MHC I.

5 La secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado puede comprender los restos de ácido nucleico correspondientes al gen completo de $\beta 2$ microglobulina humana. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos puede comprender restos de ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 21-119 de una proteína $\beta 2$ microglobulina humana (es decir, los restos de aminoácidos correspondientes a la $\beta 2$ microglobulina humana madura). En una realización alternativa, la
10 secuencia de nucleótidos puede comprender restos de ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 23-115 de una proteína $\beta 2$ microglobulina humana, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 23-119 de una proteína $\beta 2$ microglobulina humana. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácido de $\beta 2$ microglobulina humana se describen en Gussow y col., anteriormente citado.

15 Por lo tanto, el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado puede comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 23-115 de un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana, p. ej., la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 23-119 de un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano, p. ej., la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 21-119 de un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano. Como
20 alternativa, la $\beta 2$ microglobulina humana puede comprender los aminoácidos 1-119 de un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica una $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada comprende una secuencia de nucleótidos expuesta del exón 2 al exón 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana. Como
25 alternativa, la secuencia de nucleótidos comprende secuencias de nucleótidos expuestas en los exones 2, 3 y 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano. En esta realización, las secuencias de nucleótidos expuestas en los exones 2, 3 y 4 se unen operativamente para permitir la transcripción y traducción normal del gen. Por lo tanto, en una realización, la secuencia humana comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente del exón 2 al exón 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano. En una realización específica, la secuencia humana comprende una secuencia de nucleótidos
30 correspondiente del exón 2 hasta aproximadamente 267 pb después del exón 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano. En una realización específica, la secuencia humana comprende aproximadamente 2,8 kb de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano.

Por lo tanto, el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado puede estar codificado por una secuencia de
35 nucleótidos que comprenda la secuencia de nucleótidos expuesta del exón 2 al exón 4 de una $\beta 2$ microglobulina humana, p. ej., la secuencia de nucleótidos correspondiente del exón 2 al exón 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano. Como alternativa, el polipéptido puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende secuencias de nucleótidos expuestas en los exones 2, 3 y 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano. En una
40 realización específica, el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado está codificado por una secuencia de nucleótidos correspondiente desde el exón 2 hasta aproximadamente 267 pb después del exón 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano. En otra realización específica, el polipéptido humano o humanizado está codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende aproximadamente 2,8 kb de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano. Ya que el exón 4 del gen de $\beta 2$ microglobulina contiene la región 5' no traducida, el polipéptido humano o humanizado puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende los exones 2 y 3 del gen de $\beta 2$
45 microglobulina.

El experto en la técnica entenderá que aunque se describen secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos específicas para generar animales modificados genéticamente en los presentes ejemplos, también se proporcionan
50 secuencias de una o más sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas o secuencias que difieren respecto de aquellas descritas en la presente memoria debido a la degeneración del código genético.

Por lo tanto, en la presente memoria se describe un animal no humano que expresa una secuencia de $\beta 2$ microglobulina humana, en donde la secuencia de $\beta 2$ microglobulina es al menos aproximadamente 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de $\beta 2$ microglobulina humana. En una realización
55 específica, la secuencia de $\beta 2$ microglobulina humana es al menos aproximadamente 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de $\beta 2$ microglobulina humana descrita en los ejemplos. En una realización, la secuencia de $\beta 2$ microglobulina humana comprende una o más sustituciones conservativas. En una realización, la secuencia de $\beta 2$ microglobulina humana comprende una o más sustituciones no conservativas.

60 Además, en la presente memoria se describen animales no humanos en donde la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada también comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en el exón 1 de un gen de $\beta 2$ microglobulina no humano. Por lo tanto, en una realización específica, el animal no humano comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica una $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada, en donde la secuencia de nucleótidos comprende el exón 1 de una $\beta 2$ microglobulina no
65 humana y los exones 2, 3 y 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano. Por lo tanto, el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado está codificado por el exón 1 de un gen de $\beta 2$ microglobulina no humano y los

exones 2, 3 y 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano (p. ej., los exones 2 y 3 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano).

5 De manera similar a un animal no humano que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico de MHC I de humano/no humano, el animal no humano que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada puede ser un roedor (p. ej., un ratón o una rata). En una realización, el animal es un ratón.

10 Por lo tanto, en la presente memoria se describe un ratón modificado genéticamente, en donde el ratón comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado como se describe en la presente memoria. Se describe un ratón modificado genéticamente, en donde el ratón comprende en su locus endógeno de $\beta 2$ microglobulina una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado (p. ej., un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o sustancialmente humano). En algunas realizaciones, el ratón no expresa un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina endógeno (p. ej., un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina endógeno funcional) a partir de un locus de $\beta 2$ microglobulina endógeno. En algunas realizaciones, el ratón modificado genéticamente comprende una secuencia de nucleótidos que comprende el exón 1 de un gen de $\beta 2$ microglobulina de ratón y los exones 2, 3 y 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano. En algunas realizaciones, el ratón expresa el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado.

20 En la presente memoria se describe un locus de $\beta 2$ microglobulina no humana modificado que comprende una secuencia heteróloga de $\beta 2$ microglobulina. En una realización, la secuencia heteróloga de $\beta 2$ microglobulina es una secuencia humana o humanizada.

25 En una realización, el locus modificado es un locus de roedor. En una realización específica, el locus de roedor se selecciona de un locus de ratón o de rata. En una realización, el locus no humano se modifica con al menos una secuencia codificante de $\beta 2$ microglobulina humana.

30 En una realización, la secuencia de $\beta 2$ microglobulina heteróloga se une operativamente a elementos reguladores endógenos, p. ej., secuencia promotora y/o de control de la expresión endógena. En una realización específica, la secuencia de $\beta 2$ microglobulina heteróloga es una secuencia humana y la secuencia humana se une operativamente a una secuencia promotora y/o de control de la expresión endógena.

35 En un aspecto, se proporciona un locus de $\beta 2$ microglobulina no humana modificado que comprende una secuencia humana unida operativamente a una secuencia promotora y/o de control de la expresión endógena.

40 En diversos aspectos, la $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada expresada por un animal no humano modificado genéticamente o por células, embriones o tejidos procedentes de un animal no humano, conserva todos los aspectos funcionales de la $\beta 2$ microglobulina endógena y/o humana. Por ejemplo, se prefiere que la $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada se una a la cadena α del polipéptido de MHC I (p. ej., el polipéptido endógeno de MHC I no humano o humano). El polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado puede unirse, reclutar o de otro modo asociarse con cualquier otra molécula, p. ej., moléculas receptoras, de anclaje o de señalización que se asocian con la $\beta 2$ microglobulina no humana y/o humana endógena (p. ej., HFE, etc.).

45 En la presente memoria se describe un tejido o célula, en donde el tejido o la célula procede de un animal no humano como se describe en la presente memoria y comprende un gen de $\beta 2$ microglobulina o una secuencia de $\beta 2$ microglobulina heteróloga, es decir, una secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos. En una realización, el gen de $\beta 2$ microglobulina o la secuencia de $\beta 2$ microglobulina heteróloga es un gen de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado o una secuencia de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. Preferiblemente, la célula es una célula nucleada. La célula puede ser cualquier célula que se sepa que expresa el complejo MHC I, p. ej., una célula presentadora de antígenos. El polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado expresado por dicha célula puede interactuar con el MHC I no humano endógeno (p. ej., MHC I de roedor) para formar un complejo MHC I funcional. El complejo MHC I resultante puede ser capaz de interactuar con un linfocito T, p. ej., un linfocito T citotóxico. En la presente memoria se describe un complejo *in vitro* de una célula procedente de un animal no humano como se describe en la presente memoria y un linfocito T.

55 También se proporcionan células no humanas que comprenden el gen o la secuencia de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada y una secuencia humana o humanizada adicional, p. ej., el polipéptido quimérico de MHC I descrito en la presente memoria. En dicho caso, el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado puede interactuar con, p. ej., un polipéptido quimérico de MHC I de humano/no humano y puede formarse un complejo funcional de MHC I. En algunos aspectos, dicho complejo es capaz de interactuar con un TCR en un linfocito T, p. ej., un linfocito T humano o no humano. Por lo tanto, también se proporciona un complejo *in vitro* de una célula procedente de un animal no humano como se describe en la presente memoria y un linfocito T humano o no humano.

65 Otro aspecto de la descripción es un embrión de roedor (p. ej., un embrión de ratón o de rata) que comprende un gen de $\beta 2$ microglobulina o una secuencia de $\beta 2$ microglobulina heteróloga como se describe en la presente memoria. En una

realización, el embrión comprende una célula donante ES que comprende el gen de $\beta 2$ microglobulina o la secuencia de $\beta 2$ microglobulina heteróloga y células del embrión hospedador. El gen de $\beta 2$ microglobulina o la secuencia de $\beta 2$ microglobulina heteróloga es un gen de $\beta 2$ microglobulina o una secuencia de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada.

5 En la presente memoria se describe una célula no humana que comprende un cromosoma o un fragmento del mismo de un animal no humano como se describe en la presente memoria (p. ej., en donde el cromosoma o el fragmento del mismo comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado). La célula no humana puede comprender un núcleo de un animal no humano como se describe en la presente memoria. En una realización, la célula no humana comprende el cromosoma o el fragmento del mismo como resultado de una transferencia nuclear.

10 En la presente memoria se describe una célula pluripotente inducida no humana que comprende un gen de $\beta 2$ microglobulina o una secuencia de $\beta 2$ microglobulina heteróloga. En una realización, la célula pluripotente inducida procede de un animal no humano como se describe en la presente memoria. En una realización, el gen de $\beta 2$ microglobulina o la secuencia de $\beta 2$ microglobulina heteróloga es un gen o una secuencia humana o humanizada.

15 En la presente memoria se describe un hibridoma o un cuadrroma, procedente de una célula de un animal no humano, como se describe en la presente memoria. En una realización, el animal no humano es un ratón o una rata.

20 La descripción también proporciona métodos para producir un animal no humano modificado genéticamente (p. ej., un roedor modificado genéticamente, p. ej., un ratón o una rata) descritos en la presente memoria. Los métodos dan como resultado un animal cuyo genoma comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado. En un aspecto, los métodos dan como resultado un ratón modificado genéticamente cuyo genoma comprende en un locus de $\beta 2$ microglobulina endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado. En algunos casos, el ratón no expresa una $\beta 2$ microglobulina de ratón funcional a partir de un locus endógeno de $\beta 2$ microglobulina de ratón. En algunos aspectos, los métodos utilizan 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 las cepas 129 y C57BL/6 de ratón; en otra realización, las células ES son una mezcla de las cepas BALB/c y 129 de ratón.

25 En la presente memoria se describe una construcción de nucleótidos usada para generar animales no humanos modificados genéticamente. La construcción de nucleótidos puede comprender: brazos de homología 5' y 3' no humanos, un fragmento de ADN humano que comprende las secuencias de $\beta 2$ microglobulina humana y un casete de selección flanqueado por sitios de recombinación. En una realización, el fragmento de ADN humano es un fragmento genómico que comprende tanto intrones como exones de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano. En una realización, los brazos de homología no humanos son homólogos a un locus de $\beta 2$ microglobulina no humano. El fragmento genómico puede comprender los exones 2, 3 y 4 del gen de $\beta 2$ microglobulina humano. En un caso, el fragmento genómico comprende, de 5' a 3': exón 2, intrón, exón 3, intrón y exón 4, todos de la secuencia de $\beta 2$ microglobulina humana. El casete de selección puede ubicarse en cualquier parte dentro de la construcción fuera de la región codificante de $\beta 2$ microglobulina, p. ej., puede ubicarse en 3' del exón 4 de $\beta 2$ microglobulina humana. Los brazos de homología 5' y 3' no humanos pueden comprender secuencia genómica en 5' y 3' del gen de $\beta 2$ microglobulina no humano endógeno, respectivamente. En otra realización, los brazos de homología 5' y 3' no humanos comprenden secuencia genómica en 5' del exón 2 y en 3' del exón 4 del gen endógeno no humano, respectivamente.

35 En la presente memoria se describe un método para modificar un locus de $\beta 2$ microglobulina de un animal no humano (p. ej., un roedor, p. ej., un ratón o una rata) para expresar un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado descrito en la presente memoria. Un método para modificar un locus de $\beta 2$ microglobulina de un ratón para que exprese un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado comprende reemplazar en un locus de $\beta 2$ microglobulina endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica una $\beta 2$ microglobulina de ratón con una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado. En una realización de dicho método, el ratón no expresa un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina funcional a partir de un locus de $\beta 2$ microglobulina endógeno de ratón. En algunas realizaciones específicas, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en los exones 2 a 4 del gen de $\beta 2$ microglobulina humano. En otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado comprende las secuencias de nucleótidos expuestas en los exones 2, 3 y 4 del gen de $\beta 2$ microglobulina humano.

Animales modificados genéticamente para MHC I / $\beta 2$ microglobulina

60 En diversas realizaciones, la invención proporciona de manera general roedores modificados genéticamente que comprenden en su genoma secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos tanto de MHC I como de $\beta 2$ microglobulina humanos o humanizados; por lo tanto, los roedores expresan polipéptidos tanto de MHC I como de $\beta 2$ microglobulina humanos o humanizados.

65

- Las diferencias funcionales surgen en el uso de componentes del sistema mixtos humanos/no humanos. HLA de clase I se une a $\beta 2$ microglobulina con más fuerza que la clase I de ratón. Bernabeu (1984) $\beta 2$ -microglobulin from serum associates with MHC class I antigens on the surface of cultured cells, *Nature* 308:642-645. Los intentos para suprimir las diferencias funcionales se reflejan en la construcción de ratones particulares con MHC humanizados. Se han desarrollado ratones con supresión génica para H-2 de clase I y de clase 2 (en un origen de ratón KO para $\beta 2$ microglobulina) que expresa un transgén quimérico de HLA-A2.1/HLA-DR1 humano integrado aleatoriamente que tiene un $\alpha 1$ y un $\alpha 2$ de HLA-A2.1 humano y un $\alpha 3$ de H-2D^b de ratón, unido en su extremo N-terminal a través de un enlazador al extremo C-terminal de una $\beta 2$ microglobulina. Véase, p. ej., Pajot y col. (2004) A mouse model of human adaptive immune functions: *HLA-A2.1-/HLA-DR1-transgenic H-2 class I-/class II-knockout mice*, *Eur. J. Immunol.* 34:3060-3069. Según se ha comunicado, estos ratones generan respuestas de anticuerpo específico de antígeno y de CTL contra el virus de la hepatitis B, mientras que los ratones transgénicos únicamente para HLA-A2.1 o los ratones con supresión génica para H-2 de clase I/clase II no. La deficiencia de los ratones que son simplemente transgénicos para los genes surge probablemente de la capacidad de dichos ratones para emplear genes endógenos de clase I y/o clase II para esquivar cualquier transgén, una opción no disponible para los ratones con supresión génica de MHC. Sin embargo, los ratones pueden expresar al menos H-2D^b, probablemente debido a los cruzamientos en el origen de ratón con supresión génica de $\beta 2$ microglobulina (véase Pajot y col., anteriormente citado; que aparentemente comprendía un locus de clase I y de clase II endógeno intacto).
- La expresión en la superficie celular de la fusión quimérica con $\beta 2$ microglobulina humana es según se ha comunicado menor que la expresión de MHC endógeno, pero la capacidad de supervivencia/velocidad de eliminación por NK no se ha comunicado, como tampoco la velocidad de auto-eliminación de NK. Pajot y col., anteriormente citado. Se observó cierta mejora en los números de linfocitos T CD8+ frente a ratones con supresión génica de $\beta 2$ microglobulina deficientes para MHC de clase I (2-3 % de los esplenocitos totales frente a 0,6-1 % en los ratones KO para $\beta 2$). Sin embargo, el uso de la región variable de linfocitos T mostró perfiles alterados para los segmentos génicos BV 5.1, BV 5.2 y BV 11. Las respuestas de linfocitos T tanto CD8+ como CD4+ se restringieron según se comunicó al antígeno de la hepatitis B adecuado usado para inmunizar a los ratones, aunque al menos dos ratones eliminaron células que portaban cualquiera de los antígenos, habiéndose inmunizado a los ratones solo con un antígeno, lo que puede deberse a la falta de inhibición de células NK o a la falta de selectividad de las células NK.
- Como se ha mencionado anteriormente, los ratones transgénicos tanto para MHC I humano como para $\beta 2$ microglobulina humana comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica de MHC I/ $\beta 2$ microglobulina, en donde las partes de MHC I y de $\beta 2$ microglobulina están contenidas dentro de una sola cadena de polipéptido, dando como resultado que la cadena α de MHC I y la $\beta 2$ microglobulina estén unidas covalentemente y por lo tanto ancladas en la superficie celular. Se proporciona un ratón que comprende en su genoma dos secuencias de nucleótidos independientes, una que codifica un polipéptido de MHC I humano o humanizado y la otra que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado. El ratón proporcionado en la presente memoria expresará un complejo MHC I que se asemeja más estrechamente a un complejo MHC I presente en la naturaleza, en donde la cadena α de MHC I y la $\beta 2$ microglobulina se proporcionan en dos cadenas de polipéptido separadas, asociándose la $\beta 2$ microglobulina no covalentemente a la cadena α de MHC I.
- Por lo tanto, la presente descripción proporciona un animal no humano que comprende en su genoma: una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I humano o humanizado y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado. En la presente memoria se describe un animal no humano que comprende en su genoma: (a) una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico de MHC I de humano/no humano, en donde la parte humana del polipéptido quimérico comprende un dominio de unión a péptidos o un dominio extracelular de un MHC I humano (p. ej., HLA-A, HLA-B o HLA-C; p. ej., HLA-A2) y (b) una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado.
- La primera secuencia de nucleótidos puede estar ubicada en un locus endógeno de MHC I no humano, de tal forma que el animal comprende en su genoma un reemplazo en el locus de MHC I de la totalidad o parte del gen de MHC I endógeno (p. ej., una parte que codifica un dominio de unión a péptidos o un dominio extracelular) con la secuencia de MHC I humana correspondiente. Por lo tanto, el animal puede comprender en un locus endógeno de MHC I una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de un MHC I humano (p. ej., HLA-A, HLA-B o HLA-C; p. ej., HLA-A2) y dominios transmembrana y citoplasmáticos de MHC I no humano endógeno (p. ej., H-2K, H-2D, etc., p. ej., H-2Kb). En un aspecto, el animal es un ratón y la primera secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de una HLA-A2 humana (p. ej., HLA-A2.1) y los dominios transmembrana y citoplasmáticos de una H-2K de ratón (p. ej., H-2Kb).
- La segunda secuencia de nucleótidos puede estar ubicada en un locus endógeno de $\beta 2$ microglobulina no humano, de tal forma que el animal comprende en su genoma un reemplazo en el locus de $\beta 2$ microglobulina de la totalidad o una parte del gen de $\beta 2$ microglobulina endógeno por la secuencia correspondiente de $\beta 2$ microglobulina humana. La segunda secuencia de nucleótidos puede comprender una secuencia de nucleótidos expuesta del exón 2 al exón 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano. Como alternativa, la segunda secuencia de nucleótidos puede comprender secuencias de nucleótidos expuestas en los exones 2, 3 y 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano. En esta realización, las secuencias de nucleótidos se unen operativamente entre sí. La

segunda secuencia de nucleótidos puede también comprender la secuencia del exón 1 del gen de $\beta 2$ microglobulina no humano.

5 En un aspecto, el animal no expresa un MHC I funcional a partir de un locus endógeno de MHC I no humano (p. ej., no expresa un dominio de unión a péptidos o un dominio extracelular del MHC I endógeno) y el animal no expresa un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina funcional a partir de un locus endógeno de $\beta 2$ microglobulina no humano. En algunos aspectos, el animal es homocigoto tanto para un locus de MHC I que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico de MHC I de humano/no humano como para un locus de $\beta 2$ microglobulina que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. En otros aspectos, el animal es heterocigoto tanto para un locus de MHC I que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico de MHC I de humano/no humano como para un locus de $\beta 2$ microglobulina que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada.

15 Preferiblemente, las secuencias de nucleótidos primera y segunda se unen operativamente a elementos de control de la expresión endógenos (p. ej., promotores, potenciadores, silenciadores, etc.).

20 Diversas realizaciones diferentes de las secuencias de nucleótidos primera y segunda (y de los polipéptidos que codifican) abarcadas en la presente memoria pueden entenderse fácilmente a partir de las realizaciones descritas a lo largo de la memoria descriptiva, p. ej., aquellas descritas en las secciones referentes a animales modificados genéticamente para MHC I y a animales modificados genéticamente para $\beta 2$ microglobulina.

25 En un aspecto, la descripción proporciona un ratón que comprende en su genoma (a) una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico de MHC I de humano/ratón (específicamente, el polipéptido HLA-A2/H-2K), en donde la parte humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de una HLA-A2 humana y la parte de ratón comprende los dominios transmembrana y citoplasmáticos de una H-2K de ratón y (b) una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado (p. ej., en donde la secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos expuesta del exón 2 al exón 4 del gen de $\beta 2$ microglobulina humano o las secuencias de nucleótidos expuestas en el exón 2, 3 y 4 del gen de $\beta 2$ microglobulina humano), en donde la primera secuencia de nucleótidos está ubicada en un locus de H-2K endógeno y la segunda secuencia está ubicada en un locus de $\beta 2$ microglobulina endógeno. En una realización, el ratón no expresa polipéptidos funcionales de H-2K y $\beta 2$ microglobulina de ratón a partir de sus locus endógenos respectivos. En una realización, el ratón expresa tanto el polipéptido quimérico de MHC I de humano/ratón como el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado.

35 Tal como se muestra en los siguientes ejemplos, los animales modificados genéticamente para expresar conjuntamente tanto el MHC I como la $\beta 2$ microglobulina humanos o humanizados mostraron expresión aumentada de MHC de clase I en la superficie celular en comparación con los animales humanizados solo para MHC I. En algunas realizaciones, la expresión conjunta de MHC I y $\beta 2$ microglobulina humanos o humanizados aumenta la expresión en la superficie celular de MHC I humano o humanizado en más de aproximadamente 10 %, p. ej., más de aproximadamente 20 %, p. ej., aproximadamente 50 % o más, p. ej., aproximadamente 70 %, frente a la expresión de MHC I humano o humanizado en ausencia de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada.

45 La descripción también proporciona un método para producir animales no humanos modificados genéticamente (p. ej., roedores, p. ej., ratas o ratones) cuyo genoma comprenda una primera y una segunda secuencia de nucleótidos como se describe en la presente memoria. El método comprende generalmente generar un primer animal no humano modificado genéticamente cuyo genoma comprenda una primera secuencia de nucleótidos descrita en la presente memoria (es decir, una secuencia de MHC I humana o humanizada), generar un segundo animal modificado genéticamente cuyo genoma comprenda una segunda secuencia de nucleótidos descrita en la presente memoria (es decir, una secuencia de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada) y cruzar el primer animal con el segundo animal para obtener descendencia cuyo genoma contenga ambas secuencias de nucleótidos. En una realización, los animales primero y segundo son heterocigotos para la primera y la segunda secuencia de nucleótidos, respectivamente. En una realización, los animales primero y segundo son homocigotos para la primera y la segunda secuencia de nucleótidos, respectivamente. En una realización, los animales primero y segundo se generan mediante el reemplazo de locus no humanos endógenos por las secuencias de nucleótidos primera y segunda, respectivamente. En un aspecto, los animales primero y segundo se generan mediante la utilización de las construcciones generadas mediante la tecnología VELOCIGENE®, e introduciendo clones de células ES dirigidas que portan dichas construcciones en un embrión (p. ej., un embrión de roedor, p. ej., un embrión de ratón o rata) mediante el método VELOCIMOUSE®.

60 Uso de animales modificados genéticamente

65 En diversas realizaciones, los animales no humanos modificados genéticamente descritos en la presente memoria producen ACP con MHC I y/o $\beta 2$ microglobulina humanos o humanizados sobre la superficie celular y, por consiguiente, presentan péptidos procedentes de proteínas citosólicas como epítopos para los CTL de un modo similar al humano, debido a que sustancialmente 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

- 5 inmunológico humano en el animal humanizado; para la identificación de antígenos y epítomos de antígenos que estimulan la respuesta inmunológica (p. ej., epítomos de linfocitos T, p. ej., epítomos únicos de cáncer humano), p. ej., para usar en el desarrollo de vacunas; para la identificación de linfocitos T de alta afinidad por patógenos humanos o antígenos de cáncer (es decir, linfocitos T que se unen a antígenos en el contexto del complejo MHC I humano con alta avidéz), p. ej., para su uso en terapia adaptativa con linfocitos T; 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.
- 10 El complejo MHC I se une a péptidos y los presenta sobre la superficie celular. Una vez presentados sobre la superficie en el contexto de dicho complejo, los péptidos son reconocibles por los linfocitos T. Por ejemplo, cuando el péptido procede de un patógeno u otro antígeno de interés (p. ej., un antígeno tumoral), el reconocimiento por linfocitos T puede desembocar en la activación de linfocitos T, la eliminación por macrófagos de las células que portan la secuencia de péptido presentada y la activación en linfocitos B de anticuerpos que se unen a la secuencia presentada.
- 15 Los linfocitos T interactúan con células que expresan el complejo MHC I a través del ectodominio de MHC de clase I unido al péptido y el ectodominio de CD8 del linfocito T. Los linfocitos T CD8+ que se encuentran con APC que tienen antígenos adecuados unidos a la molécula de MHC de clase I se convertirán en linfocitos T citotóxicos. Por lo tanto, los antígenos que en el contexto del MHC de clase I se unen con alta avidéz a un receptor de linfocitos T son potencialmente importantes para el desarrollo de tratamientos para patologías humanas. Sin embargo, la presentación de antígenos en el contexto del MHC I de ratón es solo hasta cierto punto relevante para enfermedades humanas, ya que los complejos de MHC humanos y de ratón reconocen a los antígenos de un modo diferente, p. ej., un MHC I de ratón puede no reconocer a los mismos antígenos o puede presentar epítomos diferentes a los de un MHC I humano. Por lo tanto, los datos más relevantes para patologías humanas se obtienen mediante el estudio de la presentación de epítomos de antígeno por el MHC I humano.
- 20 Por lo tanto, en diversas realizaciones, los roedores modificados genéticamente de la presente invención son útiles, entre otras cosas, para evaluar la capacidad de un antígeno para iniciar una respuesta inmunológica 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.
- 30 En la presente memoria se proporciona un método para determinar la antigenicidad en un ser humano de una secuencia de péptido que comprende exponer a un animal no humano modificado genéticamente como se describe en la presente memoria a una molécula que comprende la secuencia de péptido, permitir que el animal no humano desarrolle una respuesta inmunológica y detectar en el animal no humano una célula que se una a una secuencia del péptido presentado por un MHC I quimérico de humano/no humano o por un complejo MHC I humanizado (que comprende un MHC quimérico de humano/no humano y una $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada), como se describe en la presente memoria.
- 35 En la presente memoria se proporciona un método para determinar si un péptido provocará una respuesta inmunológica celular en un ser humano, que comprende exponer a un animal no humano modificado genéticamente como se describe en la presente memoria al péptido, permitir que el animal no humano genere una respuesta inmunológica y detectar en el animal no humano una célula que se una a una secuencia del péptido a través de una molécula quimérica de MHC de clase I de humano/no humano como se describe en la presente memoria. En una realización, después de la exposición el animal no humano comprende un linfocito T citotóxico (CTL) CD8+ restringido al MHC de clase I que se une al péptido. En una realización, el CTL elimina una célula que porta el péptido.
- 40 En la presente memoria se describe un método para identificar un epítomo de CTL humano que comprende exponer a un animal no humano como se describe en la presente memoria a un antígeno que comprende un epítomo de CTL putativo, permitir que el animal no humano genere una respuesta inmunológica, aislar del animal no humano un CTL CD8+ restringido al MHC de clase I que se une al epítomo e identificar el epítomo al que se une el CTL CD8+ restringido al MHC de clase I.
- 45 En la presente memoria se describe un método para identificar un péptido restringido a HLA de clase I cuya presentación por parte de una célula humana y la unión a un linfocito humano (p. ej., un linfocito T humano) dará como resultado la citotoxicidad de la célula portadora del péptido, que comprende exponer a un animal no humano (o a la célula que expresa MHC de clase I del mismo) como se describe en la presente memoria a una molécula que comprende un péptido de interés, aislar una célula del animal no humano que expresa una molécula quimérica de clase I de humano/no humano que se une al péptido de interés, exponer la célula a un linfocito humano que sea capaz de llevar a cabo citotoxicidad restringida a HLA de clase I y medir la citotoxicidad inducida por el péptido.
- 50 En la presente memoria se describe un método para identificar un antígeno que genera una respuesta de linfocitos T citotóxicos en un ser humano que comprende exponer a un ratón como se describe en la presente
- 55
- 60
- 65

memoria a un antígeno putativo, permitir que el ratón genere una respuesta inmunológica e identificar el antígeno unido a la molécula restringida a HLA-A.

En una realización, el antígeno comprende una proteína bacteriana o de la superficie o la envoltura vírica. En una realización, el antígeno comprende un antígeno sobre la superficie de una célula tumoral humana. En una realización, el antígeno comprende una vacuna putativa para su uso en un ser humano. En una realización, el antígeno comprende un epítipo humano que genera anticuerpos en un ser humano. En otra realización, el antígeno comprende un epítipo humano que genera CTL de alta afinidad que se dirigen al complejo de epítipo/MHC I.

En la presente memoria se describe un método para determinar si un presunto antígeno contiene un epítipo que, tras su exposición a un sistema inmunológico humano, generará una respuesta inmunológica restringida a HLA-A (p. ej., una respuesta restringida a HLA-A2), que comprende exponer un ratón como se describe en la presente memoria al presunto antígeno y medir una respuesta inmunológica restringida a HLA-A (p. ej., restringida a HLA-A2) específica de antígeno en el ratón.

En una realización, el antígeno putativo se selecciona de un agente biofarmacéutico o un fragmento del mismo, una proteína no propia, un antígeno de superficie de una célula no propia, un antígeno de superficie de una célula tumoral, un antígeno de superficie de una célula bacteriana o de levadura o fúngica y un antígeno de superficie o una proteína de la envoltura de un virus.

Además, los animales no humanos modificados genéticamente descritos en la presente memoria pueden ser útiles para la identificación de receptores de linfocitos T, p. ej., receptores de linfocitos T de alta avidez que reconocen a un antígeno de interés, p. ej., un antígeno tumoral o de otra enfermedad. El método puede comprender: exponer al animal no humano descrito en la presente memoria a un antígeno, permitir que el animal no humano genere una respuesta inmunológica al antígeno, aislar del animal no humano un linfocito T que comprenda un receptor de linfocitos T que se une al antígeno presentado por un MHC I humano o humanizado y determinar la secuencia de dicho receptor de linfocitos T.

En la presente memoria se proporciona un método para identificar un dominio variable de receptor de linfocitos T que tenga alta afinidad por un antígeno tumoral humano, que comprende exponer a un ratón que comprende los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de MHC I humanizado (p. ej., los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de HLA-A2) a un antígeno tumoral humano; permitir que el ratón genere una respuesta inmunológica; y aislar del ratón una secuencia de ácido nucleico que codifique un dominio variable de receptor de linfocitos T, en donde el dominio variable del receptor de linfocitos T se une al antígeno tumoral humano con una K_D de no más de aproximadamente 1 nanomolar.

En una realización, el ratón además comprende un reemplazo en el locus génico de la región variable del receptor de linfocitos T de ratón endógeno con una diversidad de segmentos génicos de región variable de receptor de linfocitos T humanos no reordenados, en donde los segmentos génicos de región variable de receptor de linfocitos T humanos no reordenados se recombinan para codificar un gen de receptor de linfocitos T quimérico de humano-ratón que comprende una región variable humana y una región constante de ratón. En una realización, el ratón comprende un transgén de CD8 humano y el ratón expresa una proteína CD8 humana funcional.

Los receptores de linfocitos T que tienen alta avidez por los antígenos tumorales son útiles en los agentes terapéuticos a base de células. Se han preparado poblaciones de linfocitos T con alta avidez por los antígenos tumorales humanos exponiendo a linfocitos T humanos a HLA-A2 que se ha mutado para minimizar la unión de CD8 a la subunidad $\alpha 3$, para seleccionar únicamente aquellos linfocitos T con una avidez extremadamente alta por el antígeno tumoral (es decir, clones de linfocitos T que reconocen el antígeno a pesar de la incapacidad de CD8 para unirse a $\alpha 3$). Véase Pittet y col. (2003) $\alpha 3$ Domain Mutants of Peptide/MHC Class I Multimers Allow the Selective Isolation of High Avidity Tumor-Reactive CD8 T Cells, *J. Immunol.* 171:1844-1849. Los animales no humanos y las células de los animales no humanos son útiles para identificar péptidos que formarán un complejo con HLA de clase I humana que se unirá con alta avidez a un receptor de linfocitos T o que activará a un linfocito portador de un receptor de linfocitos T.

La unión del antígeno/HLA de clase I a un linfocito T o la activación de un linfocito T puede medirse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. La unión y activación de APC específicas para un péptido-linfocito T son medibles. Por ejemplo, el acoplamiento de los linfocitos T a células presentadoras de antígenos que expresan HLA-A2, según se ha comunicado, provoca la acumulación de PIP2 en la inmunosinapsis, mientras que el sobrecruzamiento de moléculas de MHC de clase I no. Véase Fooksman y col. (2009) Cutting Edge: Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Concentration at the APC Side of the Immunological Synapse Is Required for Effector T Cell Function, *J. Immunol.* 182:5179-5182.

Las consecuencias funcionales de la interacción de un linfocito que porta un TCR y una APC que expresa una clase I también son medibles e incluyen la eliminación de la célula por el linfocito. Por ejemplo, los puntos de contacto en la subunidad $\alpha 2$ de HLA-A2 por CTL CD8+, según se ha comunicado, generan una señal para la eliminación independiente de Fas. Las células Jurkat que expresan HLA-A2 entran en apoptosis cuando entran en contacto (a través de anticuerpos) con epítopos en la molécula HLA-A2 (procedentes de estudios cristalográficos) que se sabe que

- entran en contacto con CD8, sin apoyarse aparentemente en el dominio citoplasmático. Véase Pettersen y col. (1998) The TCR-Binding Region of the HLA Class I $\alpha 2$ Domain Signals Rapid Fas-Independent Cell Death: A Direct Pathway for T Cell-Mediated Killing of Target Cells? J. Immunol. 160:4343-4352. Se ha propuesto que la rápida eliminación inducida por el contacto de $\alpha 2$ de HLA-A2 con un CD8 de un CTL CD8+ puede deberse principalmente a esta vía mediada por HLA-A2 independiente de Fas (*id.*), en contraposición con la eliminación mediada por el dominio $\alpha 3$ independiente de TCR, que por sí misma puede inducir apoptosis (véase, Woodle y col. (1997) Anti-human class I MHC antibodies induce apoptosis by a pathway that is distinct from the Fas antigen-mediated pathway, J. Immunol. 158:2156-2164).
- 5
- 10 La consecuencia de la interacción entre un linfocito T y una APC que muestra un péptido en el contexto del MHC I también puede medirse mediante un ensayo de proliferación de linfocitos T. Como alternativa, puede determinarse midiendo la liberación de citocinas asociada normalmente con la activación de la respuesta inmunológica. En una realización, puede usarse ELISPOT de IFN γ para monitorizar y cuantificar la activación de linfocitos T CD8+.
- 15 Como se describe en la presente memoria, la activación de linfocitos T CD8+ puede verse alterada en los animales no humanos modificados genéticamente descritos en la presente memoria debido a la unión específica de especie de CD8 a MHC I. Para las realizaciones en las que se desea una interacción de CD8 específica de especie, se expone (p. ej., *in vitro*) una célula de un animal modificado genéticamente como se describe en la presente memoria (p. ej., un roedor, p. ej., un ratón o una rata) a una célula humana, p. ej., una célula portadora de CD8 humana, p. ej., un linfocito T humano. En una realización, se expone *in vitro* a una célula que expresa MHC de clase I de un ratón como se describe en la presente memoria a un linfocito T que comprende un CD8 humano y un receptor de linfocitos T. En una realización específica, el linfocito T es un linfocito T humano. En una realización, la célula que expresa MHC de clase I del ratón comprende un péptido unido a un MHC I quimérico de humano/ratón o un complejo MHC I humanizado (que incluye $\beta 2$ microglobulina humana), el linfocito T es un linfocito T humano y se determina la capacidad del linfocito T para unirse a la célula de ratón que presenta el péptido. En una realización, se determina la activación del linfocito T humano por la célula de ratón que presenta el péptido. En una realización, se proporciona un método *in vitro* para medir la activación de un linfocito T humano por parte de la célula que presenta el péptido, que comprende exponer a un ratón o a una célula de ratón como se describe en la presente memoria a un antígeno de interés, exponer a una célula de dicho ratón o a dicha célula de ratón (que probablemente porta un péptido procedente del antígeno en complejo con MHC I humano o humanizado) a un linfocito T humano y medir la activación del linfocito T humano. En una realización, el método se usa para identificar un epítipo de linfocito T de un patógeno humano o una neoplasia humana. En una realización, el método se usa para identificar un epítipo para una vacuna.
- 20
- 25
- 30
- 35 En la presente memoria se describe un método para determinar la activación de linfocitos T por parte de un agente terapéutico humano putativo, que comprende exponer a un animal modificado genéticamente como se describe en la presente memoria a un agente terapéutico humano putativo (o, p. ej., exponer a una célula que expresa MHC I humano o humanizado de dicho animal a una secuencia de péptido del agente terapéutico putativo), exponer a una célula del animal modificado genéticamente que presenta un complejo de MHC I humano o humanizado/péptido a un linfocito T que comprende un receptor de linfocitos T humanos y un CD8 capaz de unirse a la célula del animal modificado genéticamente y medir la activación del linfocito T humano que se induce por la célula que presenta el péptido del animal modificado genéticamente.
- 40
- 45 En diversas realizaciones, se produce un complejo formado entre una célula que expresa MHC de clase I humano o humanizado de un animal como se describe en la presente memoria con un linfocito T que comprende una secuencia de CD8 humano, p. ej., un linfocito T humano o un linfocito T de un animal no humano que comprende un transgén que codifica CD8 humano. Se conocen en la técnica ratones transgénicos para CD8 humano. Tishon y col. (2000) Transgenic Mice Expressing Human HLA and CD8 Molecules Generate HLA-Restricted Measles Virus Cytotoxic T Lymphocytes of the Same Specificity as Humans with Natural Measles Virus Infection, Virology 275(2):286-293; asimismo, LaFace y col. (1995) Human CD8 Transgene Regulation of HLA Recognition by Murine T Cells, J. Exp. Med. 182:1315-1325.
- 50
- 55 Además de la capacidad para identificar antígenos y epítopos de antígenos de patógenos o neoplasias humanas, los animales modificados genéticamente de la invención pueden usarse para identificar autoantígenos relevantes para enfermedades autoinmunes humanas, por ejemplo, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, etc. Por ejemplo, Takaki y col. ((2006) HLA-A*0201-Restricted T Cells from Humanized NOD Mice Recognize Autoantigens of Potential Clinical Relevance to Type 1 Diabetes, J. Immunol. 176:3257-65) describen la utilidad de ratones NOD que portan una monocadena de HLA/ $\beta 2$ microglobulina para identificar autoantígenos para la diabetes de tipo 1. Asimismo, los animales modificados genéticamente de la invención pueden usarse para estudiar diversos aspectos de las enfermedades autoinmunes humanas. Ya que se sabe que algunos alelos polimórficos de MHC I humano están asociados con el desarrollo de determinadas enfermedades, p. ej., enfermedades autoinmunes (p. ej., enfermedad de Graves, miastenia grave, psoriasis, etc.; véase 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 and Supplementary Information and 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), podría ser útil un roedor modificado genéticamente de la invención que comprende un locus de MHC I humanizado que incluya dicho alelo como modelo de una enfermedad autoinmune. En una realización, el alelo de enfermedad es
- 60
- 65

HLA-B27 y la enfermedad es espondilitis anquilosante o artritis reactiva; por lo tanto, en una realización, el animal usado para el estudio de estas enfermedades comprende un HLA-B27 humano o humanizado.

Se conocen en la técnica otros aspectos de la inmunidad celular que implican complejos de MHC I; por lo tanto, los animales no humanos modificados genéticamente descritos en la presente memoria pueden usarse para estudiar estos aspectos de la biología inmunológica. Por ejemplo, la unión de TCR a MHC de clase I está modulada *in vivo* por factores adicionales. El miembro B de la subfamilia de receptor similar a inmunoglobulina de leucocitos (LILRB1 o LIR-1) se expresa en CTL restringidos al MHC de clase I y regula negativamente la estimulación de linfocitos T por la unión de un determinante específico a la subunidad $\alpha 3$ de moléculas de MHC de clase I en las APC. Los estudios estructurales demuestran que el sitio de unión para LIR-1 y CD8 se solapan, lo que sugiere que el LIR-1 inhibitor compite con el CD8 estimulador por la unión a las moléculas de MHC de clase I. Willcox y col. (2003) Crystal structure of HLA-A2 bound to LIR-1, a host and viral major histocompatibility complex receptor, *Nature Immunology* 4(9):913-919; asimismo, Shiriosi y col. (2003) Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(15):8856-8861. LIR-1 transduce señales inhibitoras a través de su motivo inhibitor basado en inmunorreceptor de tirosina (intracelular) (ITIM). En células NK, los estudios han demostrado que los KIR (receptores inhibidores similares a Ig de linfocitos citolíticos) que carecen de ITIM (normalmente incapaces de provocar inhibición) pueden inhibir en presencia de LIR-1 (probablemente a través del ITIM de LIR-1) unido al dominio $\alpha 3$ de una molécula de MHC de clase I (véase, Kirwin y col. (2005) Killer Cell Ig-Like Receptor-Dependent Signaling by Ig-Like Transcript 2 (ILT2/CD85j/LILRB1/LIR-1) *J. Immunol.* 175:5006-5015), lo que sugiere una cooperación entre LIR-1 unido a MHC de clase I y KIR y por lo tanto, un papel de la unión del dominio $\alpha 3$ de HLA para modular la inhibición de células NK.

Como se ha descrito anteriormente, las moléculas de MHC interactúan con células que no expresan un TCR. Entre estas células se encuentran las células NK. Las células NK son linfocitos citotóxicos (distintos de los CTL o de los linfocitos T citotóxicos) que desempeñan un papel crucial en la respuesta inmunológica celular y en particular en la inmunidad innata. Las células NK son la primera línea de defensa contra microorganismos invasores, virus y otras entidades no propias (p. ej., tumores). Las células NK se activan o inhiben a través de receptores de superficie y expresan CD8 pero no expresan TCR. Las células NK pueden interactuar con células que expresan MHC de clase I, pero la interacción es a través de la unión de CD8 al dominio $\alpha 3$ en lugar de la unión de TCR a los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ portadores de péptidos. Una función principal de las células NK es destruir células que carecen de una cantidad suficiente de proteína de superficie de MHC de clase I.

El sobrecruzamiento de moléculas de MHC de clase I sobre la superficie de las células citolíticas naturales (NK) da como resultado la fosforilación intracelular de tirosina, la migración de la molécula de MHC de clase I de la inmunosinapsis y la regulación negativa de la eliminación de células tumorales. Rubio y col. (2004) Cross-linking of MHC class I molecules on human NK cells inhibits NK cell function, segregates MHC I from the NK cell synapse, and induces intracellular phosphotyrosines, *J. Leukocyte Biol.* 76:116-124.

Otra función del MHC de clase I en células NK es aparentemente prevenir su autoeliminación. Las células NK portan tanto el receptor activante 2B4 como el ligando de 2B4, CD48; parece ser que el MHC de clase I se une a 2B4 e impide su activación por CD48. Betser-Cohen (2010) The Association of MHC Class I Proteins with the 2B4 Receptor Inhibits Self-Killing of Human NK Cells, *J. Immunol.* 184:2761-2768.

Por lo tanto, los animales no humanos modificados genéticamente descritos en la presente memoria pueden usarse para estudiar estos procesos no mediados por TCR o por CTL y para diseñar estrategias para su modulación.

Ejemplos

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. Construcción y caracterización de ratones modificados genéticamente para HLA-A2

Ejemplo 1.1: Expresión de HLA-A2/H-2K en células MG87.

Se preparó una construcción vírica que contenía una secuencia génica quimérica de HLA-A2/H-2K (Fig. 4A) usando técnicas de clonación molecular convencionales conocidas para un experto en la materia para analizar la expresión de MHC I quimérico de humano/ratón en células transfectadas.

Brevemente, se preparó una construcción vírica quimérica de HLA-A humana/H-2K de ratón usando las secuencias exónicas que codifican los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de la cadena α y clonándolas en fase con las secuencias codificantes de ratón para los dominios transmembrana y citoplasmáticos del gen H-2K (Fig. 4A,

pMIG-HLA-A2/H2K). Como se ilustra en la Fig. 4, la construcción contenía una secuencia indicadora de IRES-GFP, que permitía determinar si la construcción podía expresarse en células tras su transfección.

Se prepararon virus que contenían la construcción quimérica anterior y se propagaron en células de riñón embrionario 293 (293T). Las células 293T se sembraron en placas de 10 cm y se dejaron crecer hasta una confluencia del 95 %. Se preparó una mezcla de transfección de ADN con 25 µg de pMIG-HLA-A2/H2K, pMIG-HLA-A2 humano o pMIG-β2 microglobulina humanizada y 5 µg de pMDG (plásmido de la envuelta), 15 µg de pCL-Eco (construcción de empaquetado sin la señal de empaquetado ψ), 1 ml de Opti-MEM (Invitrogen). A esta mezcla de ADN de 1 ml se le añadieron 80 µl de Lipofectamine-2000 (Invitrogen) en 1 ml de Opti-MEM, que se habían mezclado previamente y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. La mezcla de Lipofectamine/ADN se dejó incubar durante 20 minutos adicionales a temperatura ambiente y después se añadió a placas de 10 cm y se incubaron las placas a 37 °C. Se recogió el medio de las células después de 24 horas y se añadieron a las células 10 ml de medio R10 fresco (RPMI 1640 + FBS al 10 %). Este intercambio de medio se repitió dos veces. Después de un total de cuatro días, se agrupó el medio recogido, se centrifugó y se hizo pasar a través de un filtro estéril para eliminar los restos celulares.

Los virus propagados producidos anteriormente se usaron para transducir células MG87 (fibroblastos de ratón). Se lavaron células MG87 de un solo matraz T-75 una vez con PBS. Se añadieron 3 ml de tripsina al 0,25 % + EDTA a las células y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante tres minutos. Se añadieron 7 ml de D10 (DMEM alto en glucosa; suero fetal bovino al 10 %) a la mezcla de células/tripsina y se transfirió a un tubo de 15 ml para centrifugarla a 1300 rpm durante cinco minutos. Después de centrifugar las células, se aspiró el medio y se resuspendieron las células en 5 ml de D10. Se contaron las células y se colocaron ~3,0x10⁵ células por pocillo en una placa de 6 pocillos. Se añadió el virus pMIG-HLA-A2 humano o pMIG-HLA-A2/H-2K solo o con pMIG-β2 microglobulina humanizada a los pocillos, con células no transducidas como control. Las células se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 2 días. Las células se prepararon para análisis FACS (usando anticuerpo anti-HLA-A2, clon BB7.2) para la expresión de HLA-A2 con o sin β2 microglobulina.

Las gráficas (Fig. 4B), así como la tabla que resume los datos obtenidos de las gráficas (Fig. 4C) demuestran que la transducción conjunta con β2 microglobulina humanizada aumenta la expresión de HLA-A2 humano o de HLA-A2/H-2K quimérico de humano/no humano, tal como se demuestra por el desplazamiento de las curvas hacia la derecha.

Ejemplo 1.2. Diseño de un locus quimérico de HLA-A2/H-2K.

Se humanizó el gen H-2K de ratón en una sola etapa mediante la construcción de un solo vector objetivo a partir de ADN de cromosoma artificial bacteriano (BAC) de humano y ratón usando la tecnología VELOCIGENE® (véase, p. ej., la patente US-6.586.251 y Valenzuela y col. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. *Nat. Biotech.* 21(6): 652-659). El ADN del clon de BAC de ratón, RP23-173k21 (Invitrogen) se modificó por recombinación de homólogos para reemplazar el ADN genómico que codificaba los dominios α1, α2 y α3 del gen de H-2K de ratón por ADN genómico humano que codificaba las subunidades α1, α2 y α3 del gen de HLA-A humano (Fig. 5).

Brevemente, se reemplazó la secuencia genómica que codificaba las subunidades α1, α2 y α3 del gen H-2K de ratón por el ADN genómico que codifica los dominios α1, α2 y α3 del gen HLA-A*0201 humano en un solo evento de direccionamiento usando un vector objetivo que comprendía un casete de higromicina flanqueado por sitios de *loxP* con un brazo de homología 5' de ratón que contenía secuencia 5' del locus de H-2K de ratón que incluía la región 5' no traducida (UTR; el brazo de homología 5' se expone en la Id. de sec. n.º: 1) y un brazo de homología 3' de ratón que contiene secuencia genómica 3' de la secuencia codificante de α3 de H-2K de ratón (el brazo de homología 3' se expone en la Id. de sec. n.º: 2).

La construcción final para dirigir el locus génico de H-2K endógeno de 5' a 3' incluía (1) un brazo de homología 5' que contenía ~200 pb de secuencia genómica de ratón 5' del gen H-2K endógeno que incluía la 5'UTR, (2) ~1339 pb de secuencia genómica humana que incluía la secuencia líder de HLA-A*0201, el líder de HLA-A*0201/intrón α1, el exón α1 de HLA-A*0201, el intrón α1-α2 de HLA-A*0201, el exón α2 de HLA-A*0201, ~316 pb del extremo 5' del intrón α2-α3, (3) un sitio 5' *loxP*, (4) un casete de higromicina, (5) un sitio 3' *loxP*, (6) ~580 pb de secuencia genómica humana que incluía ~304 pb del extremo 3' del intrón α2-α3, el exón α3 de HLA-A*0201 y (7) un brazo de homología 3' que contenía ~200 pb de secuencia genómica de ratón que incluía el intrón entre α3 de H-2K de ratón y secuencias codificantes de transmembrana (véase la Fig. 5 para una representación esquemática del vector objetivo de H-2K). La secuencia de 149 nucleótidos en la unión de las secuencias de ratón/humanas en el 5' del vector objetivo se expone en la Id. de sec. n.º: 3 y la secuencia de 159 nucleótidos en la unión de las secuencias humanas/de ratón en el 3' del vector objetivo se expone en la Id. de sec. n.º 4. La recombinación de homólogos con este vector objetivo creó un locus de H-2K de ratón modificado que contenía ADN genómico humano que codificaba los dominios α1, α2 y α3 del gen de HLA-A*0201 unidos operativamente a las secuencias codificantes del dominio transmembrana y citoplasmático de H-2K de ratón endógenas que, tras su traducción, da lugar a la formación de una proteína quimérica de MHC de clase I de humano/ratón.

El ADN de BAC diana se usó para electroporar células ES F1H4 de ratón para crear células ES modificadas para generar ratones que expresan una proteína quimérica de MHC de clase I sobre la superficie de células nucleadas (p. ej., linfocitos T y B, macrófagos y neutrófilos). Las células ES que contenían un sitio de inserción de secuencias de HLA humanas se identificaron mediante un ensayo cuantitativo TAQMAN™. Se diseñaron conjuntos de cebadores y sondas específicos para detectar la inserción de secuencias de HLA humano y los casetes de selección asociados (ganancia de alelo, GOA) y la pérdida de secuencias endógenas de ratón (pérdida de alelo, LOA). La tabla 1

5

10 Tabla 1: Sondas usadas para el genotipado

Sonda	Ensayo	Región detectada por la sonda	Secuencia	Id. de sec. n.º
HYG	GOA	Casete de higromicina	ACGAGCGGGT TCGGCCATT C	5
1665H1	GOA	Intrón $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de HLA-A2 humano	AGTCCTTCAG CCTCCACTCA GGTCAGG	6
1665H2	GOA	Exón $\alpha 2$ de HLA-A2 humano	TACCACCAGT ACGCCTACGA CGGCA	7
5112H2	GOA	Intrón $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de HLA-A2 humano	ATCCTGTACC AGAGAGTG	8

El casete de selección puede retirarse mediante métodos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, las células ES que portan el locus quimérico de MHC de clase I de humano/ratón pueden transfectarse con una construcción que expresa Cre para retirar el casete de higromicina “*loxeador*” introducido por la inserción de la construcción directora que contenía secuencias génicas de HLA-A*0201 humanas (véase la Fig. 5). Opcionalmente, el casete de higromicina puede eliminarse por cruzamiento con ratones que expresan recombinasa Cre. Opcionalmente, el casete de higromicina queda retenido en los ratones.

15

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, p. ej., la patente US-7.294.754 y Poueymirou y col. (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor gene-targeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses, Nature Biotech. 25(1):91-99). Los VELOCIMICE® (ratones de F0 procedentes por completo de la célula ES donante) que portaban independientemente un gen quimérico de MHC de clase I se identificaron por genotipado usando un ensayo de modificación de alelos (Valenzuela y col., anteriormente citado) que detecta la presencia de las secuencias génicas únicas humanas de HLA-A*0201.

25

Ejemplo 1.3. Expresión *in vivo* de HLA-A/H-2K quimérico en ratones modificados genéticamente.

30

Se analizó un ratón heterocigoto que portaba un locus de H-2K modificado genéticamente como se describe en el ejemplo 1.2 respecto de la expresión de la proteína quimérica HLA-A/H-2K en las células del animal.

35

Se obtuvo sangre por separado de un ratón de tipo natural y de uno heterocigoto quimérico para HLA-A/H-2K (A2/H2K). Las células se tiñeron para HLA-A2 humano con un anticuerpo anti-HLA-A conjugado a ficoeritrina (PE) y se expusieron a un anticuerpo anti-H-2K^b conjugado a alofocianina durante una hora a 4 °C. Se analizó la expresión de las células por citometría de flujo usando anticuerpos específicos para HLA-A y H-2K^b. La Fig. 6A muestra la expresión de H-2K^b y HLA-A2 en el tipo natural y heterocigoto quimérico, expresando el heterocigoto quimérico ambas proteínas. La Fig. 6B muestra la expresión tanto de H-2K^b como de HLA-A2/H-2K quimérico en el ratón heterocigoto.

40

Ejemplo 2: Construcción y caracterización de ratones modificados genéticamente para $\beta 2$ microglobulina

45

Ejemplo 2.1: Diseño de un locus de $\beta 2$ microglobulina humanizado

Se humanizó el gen de $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2m$) de ratón en una sola etapa mediante la construcción de un solo vector objetivo a partir de ADN de cromosoma artificial bacteriano (BAC) de humano y ratón usando la tecnología VELOCIGENE® (véase, p. ej., la patente US-6.586.251 y Valenzuela y col., anteriormente citado).

50

Brevemente, se generó un vector objetivo mediante recombinación de homólogos bacteriana que contenía brazos de homología cadena arriba y cadena abajo con $\beta 2m$ de ratón a partir del clon de BAC 89C24 de la biblioteca RPCI-23 (Invitrogen). Los brazos de homología de ratón se diseñaron para flanquear un fragmento de ADN de $\beta 2m$ humana de 2,8 kb que se extiende del exón 2 hasta aproximadamente 267 nucleótidos cadena abajo del exón 4 no codificante (Fig. 7). Se diseñó un casete de selección de fármaco (neomicina) flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinasa (p. ej., sitios de *loxP*) dentro del vector objetivo para permitir su posterior selección. El vector objetivo final se linealizó y electroporó en una línea celular ES de ratón F1H4 (Valenzuela y col. anteriormente citado).

55

Los clones de células ES diana con el casete de fármaco retirado (mediante la introducción de recombinasa Cre) se introdujeron en un embrión de ratón en estadio de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (véase la patente US- 7.294.754 y Poueymirou y col., anteriormente citado). Se identificaron VELOCIMICE® (ratones de F0 procedentes completamente de la célula ES donante) que portaban el gen $\beta 2m$ humanizado explorando respecto de la pérdida de alelo de ratón y de la ganancia de alelo humano usando un ensayo de modificación de alelos (Valenzuela y col., anteriormente citado).

Ejemplo 2.2: Caracterización de ratones humanizados para $\beta 2$ microglobulina

Los ratones heterocigotos para un gen de $\beta 2$ microglobulina humanizado ($\beta 2m$) se evaluaron respecto de su expresión usando citometría de flujo (Fig. 8 y 9).

Brevemente, se aisló sangre de los grupos (n=4 por grupo) de ratones de tipo natural, humanizados para $\beta 2m$, humanizados para MHC de clase I (es decir, HLA humano) y doblemente humanizados para $\beta 2m$ y MHC de clase I usando técnicas conocidas en la técnica. Se trató la sangre de cada uno de los ratones en cada grupo con tampón de lisis ACK (Lonza Walkersville) para eliminar los glóbulos rojos. Las células restantes se tiñeron usando anticuerpos anti-CD3 (17A2), anti-CD19 (1D3), anti-CD11b (M1/70), anti-HLA de clase I humano y anti- $\beta 2$ microglobulina humana (2M2) conjugados a fluorocromo. Se llevó a cabo citometría de flujo usando un BD-FACSCANTO™ (BD Biosciences).

La expresión de HLA de clase I humano se detectó en células de animales humanizados sencillos y doblemente humanizados, mientras que la expresión de $\beta 2$ microglobulina se detectó únicamente en las células de ratones doblemente humanizados (Fig. 8). La expresión conjunta de $\beta 2m$ humana y de HLA de clase I humano dio como resultado un aumento de la cantidad detectable de HLA de clase I humano en la superficie celular, en comparación con la expresión de HLA de clase I humano en ausencia de $\beta 2m$ humana (Fig.9; intensidad media de fluorescencia de 2370 frente a 1387).

Ejemplo 3. Respuesta inmunológica a péptidos de virus de la gripe y de Epstein-Barr (EBV) presentados por APC de ratones modificados genéticamente que expresan HLA-A2/H-2K y $\beta 2$ microglobulina humanizada.

Se exploraron PBMC de varios donantes humanos tanto respecto de la expresión de HLA-A2 como de su capacidad para generar una respuesta a péptidos de la gripe y de EBV. Se seleccionó un solo donante para los experimentos posteriores.

Se aislaron linfocitos T humanos de PBMC del donante seleccionado usando selección negativa. Se aislaron células no T esplénicas de un ratón heterocigoto para un gen de HLA-A2/H-2K quimérico y heterocigotos para uno de $\beta 2$ -microglobulina humanizado y de un ratón de tipo natural. Se añadieron aproximadamente 50.000 células no T esplénicas de los ratones a una placa ELISPOT recubierta con anticuerpo anti-IFN γ humano. Se añadió péptido de la gripe (10 micromolar) o un grupo de péptidos de EBV (5 micromolar cada uno). Se añadió Poli IC a razón de 25 microgramos/pocillo y se incubaron los pocillos durante tres horas a 37 °C con CO₂ al 5 %. Se añadieron linfocitos T humanos (50.000) y anti-CD28 humano a las células no T esplénicas y los péptidos y se incubaron los pocillos durante 40 horas a 37 °C con CO₂ al 5 %, tras lo cual se llevó a cabo un ensayo ELISPOT de IFN γ .

Tal como se muestra en la Fig. 10, los linfocitos T humanos fueron capaces de generar una respuesta a los péptidos de gripe y EBV cuando se presentaron por APC de ratón que expresaban el HLA-A2/H-2K quimérico y la $\beta 2$ microglobulina humanizada en su superficie.

Equivalentes

Los expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de determinar usando únicamente experimentación rutinaria muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descrita en la presente memoria. Se pretende que dichos equivalentes estén abarcados por las siguientes reivindicaciones.

ES 2 651 517 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> Ratones con complejo mayor de histocompatibilidad modificado genéticamente

<130> 0825A-WO

<150> 61/552,582
<151> 28-10-2011

<150> 61/552,587
<151> 28-10-2011

<150> 61/700,908
<151> 14-09-2012

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 200
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Brazo de homología 5' de la construcción directora de MHC I

<400> 1
ggattcccca tctccacagt ttcacttctg cacctaacct gggtcaggtc cttctgtccg 60
gacactgttg acgcgcagtc agctcttacc cccattgggt ggcgcgatca cccaagaacc 120
aatcagtgtc gccgcggacg ctggatataa agtccaagca gcccgcagaa ctcagaagtc 180
gcgaatcgcc gacaggtgcg 200

<210> 2
<211> 200
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Brazo de homología 3' de la construcción directora de MHC I

<400> 2
gtaaggagag tgtgggtgca gagctgggt cagggaaagc tggagctttc tgcagaccct 60
gagctgctca gggctgagag ctggggatcat gaccctcacc ttcatttctt gtacctgtcc 120
ttcccagagc ctctccatc cactgtctcc aacatggcga ccgttgctgt tctggttgtc 180
cttgagctg caatagtcac 200

<210> 3
<211> 149
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia del locus quimérico de MHC I de humano/ratón en la unión 5' de las secuencias de ratón/humano

<400> 3

ES 2 651 517 T3

```

agtgtcgccg cggacgctgg atataaagtc cacgcagccc gcagaactca gaagtcgcca      60
atcgccgaca ggtgcatgg cgcgcagccc gccccgaacc ctcgtcctgc tactctcggg      120
ggctctggcc ctgaccaga cctggggcgg                                         149

<210> 4
<211> 159
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia del locus quimérico de MHC I de humano/ratón en la unión 3'
      de las secuencias de humano/ratón

<400> 4
gggtgtgctt tctggacagg agcagagata cacctgcat gtgcagcatg agggtttgcc      60
caagcccctc acctgagat ggggtaagga gactgtgggt gcagagctgg ggtcagggaa      120
agctggagct ttctgcagac cctgagctgc tcagggctg                               159

<210> 5
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda para la detección del casete de higromicina

<400> 5
acgagcgggt tggccatt c                                                    21

<210> 6
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda para la detección del intrón alfa2-alfa3 de HLA-A2 humano

<400> 6
agtccttcag cctccactca ggctcagg                                         27

<210> 7
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda para la detección del exón alfa2 de HLA-A2 humano

<400> 7
taccaccagt acgcctacga cggca                                             25

<210> 8
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sonda para la detección del intrón alfa2-alfa3 de HLA-A2 humano

```

ES 2 651 517 T3

<400> 8
atcctgtacc agagagtg

18

REIVINDICACIONES

1. Un roedor que comprende en un locus endógeno del Complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC I) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico de MHC I de roedor/humano, en donde la porción humana del polipéptido quimérico comprende los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un polipéptido de MHC I humano, en donde la porción de roedor del polipéptido quimérico comprende los dominios transmembrana y citoplasmático de un polipéptido endógeno de MHC I de roedor y en donde el roedor expresa el polipéptido quimérico de MHC I de humano/roedor.
2. El roedor de la reivindicación 1, en donde el roedor no expresa los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un polipéptido endógeno de MHC I de roedor a partir de un locus endógeno de MHC I de roedor.
3. El roedor de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la secuencia de nucleótidos está unida operativamente a elementos reguladores endógenos de roedor.
4. El roedor de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la porción humana del polipéptido quimérico comprende una secuencia líder humana.
5. El roedor de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido de MHC I humano se selecciona del grupo que consiste en HLA-A, HLA-B y HLA-C.
6. El roedor de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el roedor es un ratón.
7. El ratón de la reivindicación 6, en donde el locus endógeno es un locus de H-2K de ratón.
8. El ratón de la reivindicación 7, en donde el polipéptido endógeno de MHC I de roedor es H-2K.
9. El ratón de la reivindicación 6 que comprende en un locus endógeno de H-2K una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico de MHC I de humano/ratón, en donde la porción humana del polipéptido quimérico comprende los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un polipéptido de HLA-A2 humano y la porción de ratón comprende los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido de H-2K de ratón, y en donde el ratón expresa el polipéptido quimérico HLA-A2/H-2K.
10. El ratón de la reivindicación 9, en donde el ratón no expresa los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del polipéptido de H-2K de ratón a partir de un locus endógeno de H-2K.
11. El ratón de la reivindicación 9 o 10, en donde la porción humana del polipéptido quimérico comprende una secuencia líder humana.
12. El ratón de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en donde la secuencia de nucleótidos está unida operativamente a elementos reguladores endógenos de ratón.
13. El ratón de una cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en donde el polipéptido de HLA-A2 humano es un polipéptido de HLA-A2.1.
14. El ratón de una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en donde el locus de H-2K de ratón es un locus de H-2Kb.
15. Un método para modificar un locus de MHC I de un ratón para que exprese un polipéptido quimérico de MHC I de humano/ratón, en donde el método comprende reemplazar en el locus endógeno de MHC I una secuencia de nucleótidos que codifica los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un polipéptido de MHC I de ratón por una secuencia de nucleótidos que codifica los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un polipéptido de MHC I humano, en donde el ratón expresa los dominios transmembrana y citoplasmáticos del polipéptido de MHC I de ratón.
16. El método de la reivindicación 15, en donde el ratón no expresa los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del polipéptido de MHC I de ratón a partir de un locus endógeno de MHC I de ratón.
17. El método de la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en donde el locus de MHC I de ratón es un locus de H-2K, y el polipéptido de MHC I de ratón es un polipéptido de H-2K.
18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 15-17, en donde el polipéptido de MHC I humano es un polipéptido de HLA-A.

19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en donde el reemplazo se efectúa en una célula ES individual, y la célula ES individual se introduce en un embrión de ratón para producir un ratón.
20. Un roedor según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 que además comprende en un locus endógeno de $\beta 2$ microglobulina de roedor una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de $\beta 2$ microglobulina humana, en donde el roedor expresa un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado.
21. El roedor de la reivindicación 20, en donde el roedor no expresa un polipéptido endógeno de $\beta 2$ microglobulina de roedor funcional a partir de un locus endógeno de $\beta 2$ microglobulina de roedor.
22. El roedor de la reivindicación 20 o la reivindicación 21, en donde la secuencia de nucleótidos está unida operativamente a elementos reguladores endógenos de $\beta 2$ microglobulina de roedor.
23. El roedor de una cualquiera de las reivindicaciones 20-22, en donde la secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos expuesta del exón 2 al exón 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano.
24. El roedor de una cualquiera de las reivindicaciones 20-23, en donde la secuencia de nucleótidos comprende secuencias de nucleótidos expuestas en los exones 2, 3 y 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano.
25. El roedor de una cualquiera de las reivindicaciones 20-24, en donde la secuencia de nucleótidos además comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en el exón 1 de un gen de $\beta 2$ microglobulina de roedor.
26. El roedor de una cualquiera de las reivindicaciones 20-25, en donde el roedor es un ratón.
27. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 15-19, en donde el método además comprende modificar un locus de $\beta 2$ microglobulina de un ratón para que exprese un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado reemplazando en el locus endógeno de $\beta 2$ microglobulina de ratón una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina de ratón por una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado.
28. El método de la reivindicación 27, en donde el ratón no expresa un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina de ratón funcional a partir de un locus endógeno de $\beta 2$ microglobulina.
29. El método de la reivindicación 27 o la reivindicación 28, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado comprende una secuencia de nucleótidos expuesta del exón 2 al exón 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano.
30. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 27-29, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado comprende secuencias de nucleótidos expuestas en los exones 2, 3 y 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano.
31. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 27-30, en donde el locus modificado conserva una secuencia de nucleótidos del exón 1 de un gen de $\beta 2$ microglobulina de ratón.
32. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 27-31, en donde el reemplazo se efectúa en una célula ES individual, y la célula ES individual se introduce en un embrión de ratón para producir un ratón.
33. El ratón de la reivindicación 9 que comprende en su genoma:
una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico de MHC I de humano/ratón, en donde una porción humana del polipéptido quimérico comprende los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un HLA-A2 humano y una porción de ratón comprende los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un H-2K de ratón;
y
una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado, en donde la primera secuencia de nucleótidos está ubicada en un locus endógeno de H-2K y la segunda secuencia de nucleótidos está ubicada en un locus endógeno de $\beta 2$ microglobulina de ratón, y en donde el ratón expresa el polipéptido quimérico de MHC I de humano/ratón y el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado.
34. El ratón de la reivindicación 33, en donde el ratón no expresa polipéptidos endógenos de H-2K y $\beta 2$ microglobulina de ratón a partir de sus locus endógenos.
35. El ratón de la reivindicación 33 o la reivindicación 34, en donde la primera secuencia de nucleótidos está unida operativamente a elementos reguladores endógenos de H-2K de ratón, y la segunda secuencia de nucleótidos está unida operativamente a elementos reguladores endógenos de $\beta 2$ microglobulina de ratón.

36. El ratón de una cualquiera de las reivindicaciones 33-35, en donde la segunda secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos expuesta del exón 2 al exón 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano.
37. El ratón de una cualquiera de las reivindicaciones 33-36, en donde la segunda secuencia de nucleótidos comprende secuencias de nucleótidos expuestas en los exones 2, 3 y 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humano.
38. El ratón de una cualquiera de las reivindicaciones 33-37, en donde la expresión del polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado aumenta la expresión del polipéptido quimérico de MHC I de humano/ratón en comparación con la expresión del polipéptido quimérico de MHC I de humano/ratón en ausencia de la expresión del polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado.

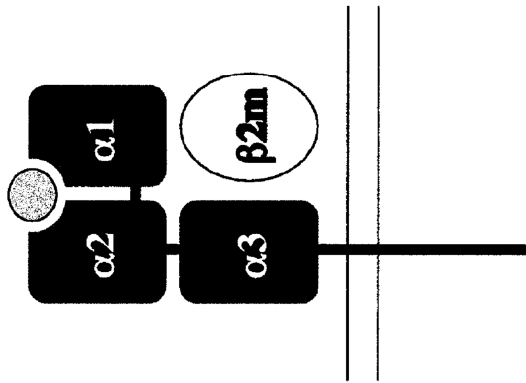


FIG. 1

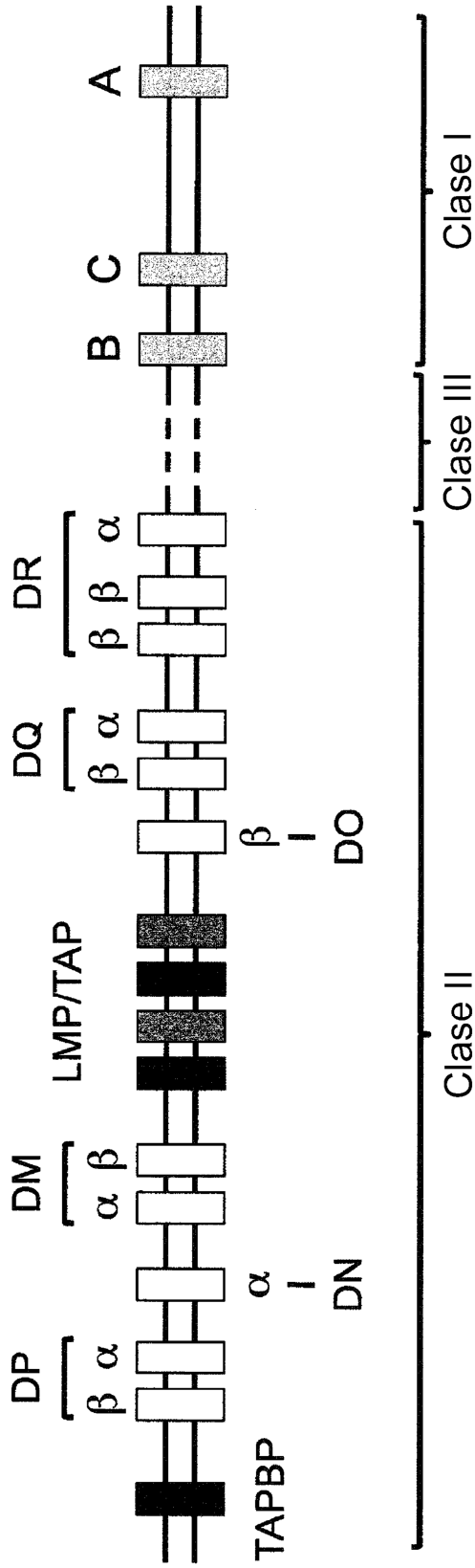


FIG. 2

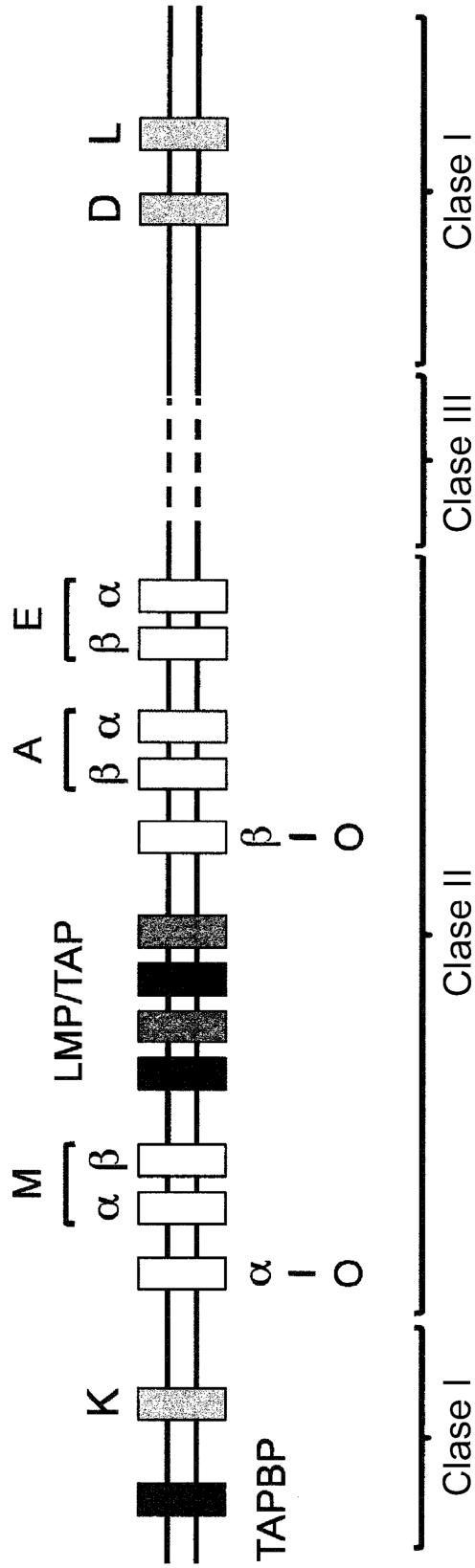


FIG. 3

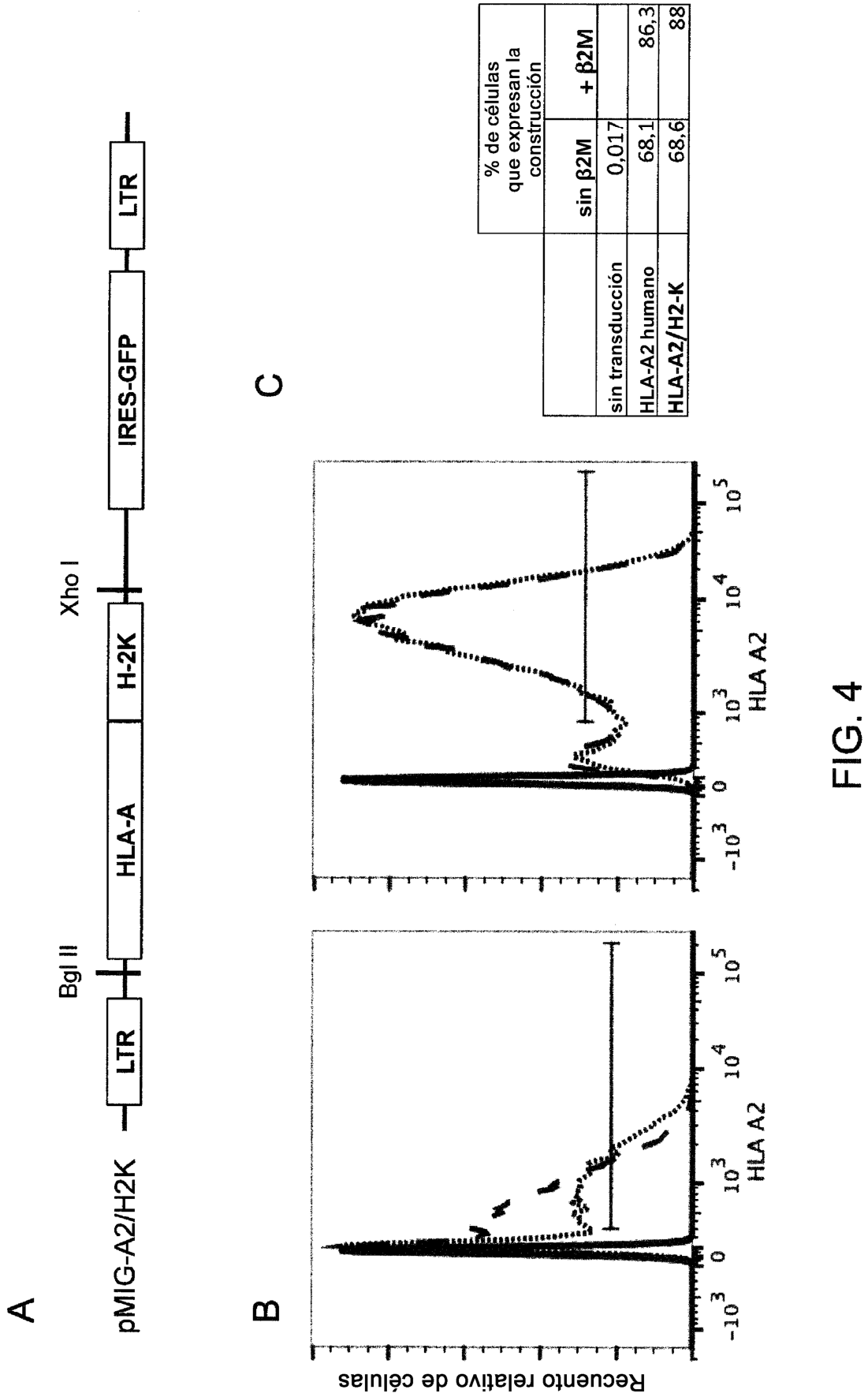


FIG. 4

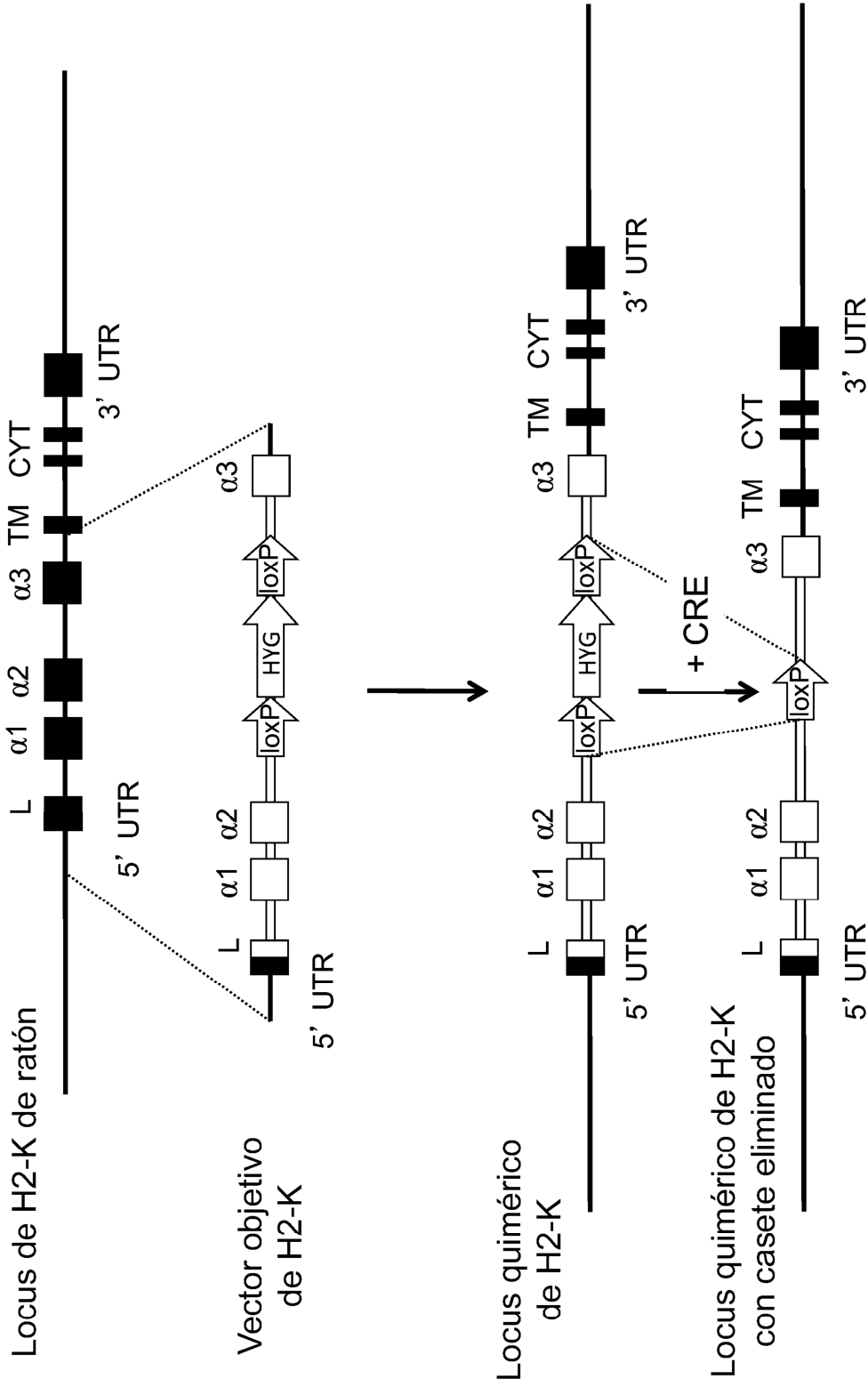


FIG. 5

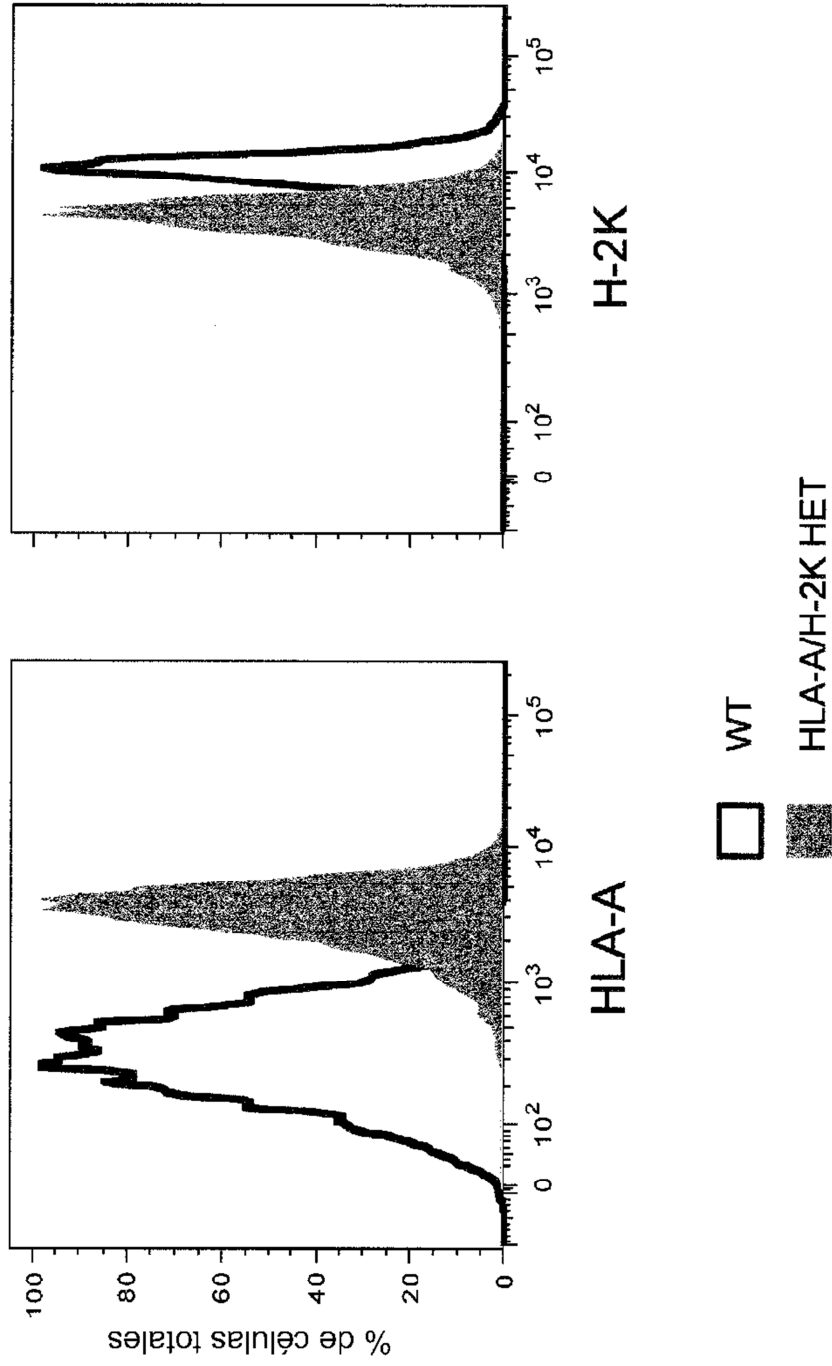


FIG. 6A

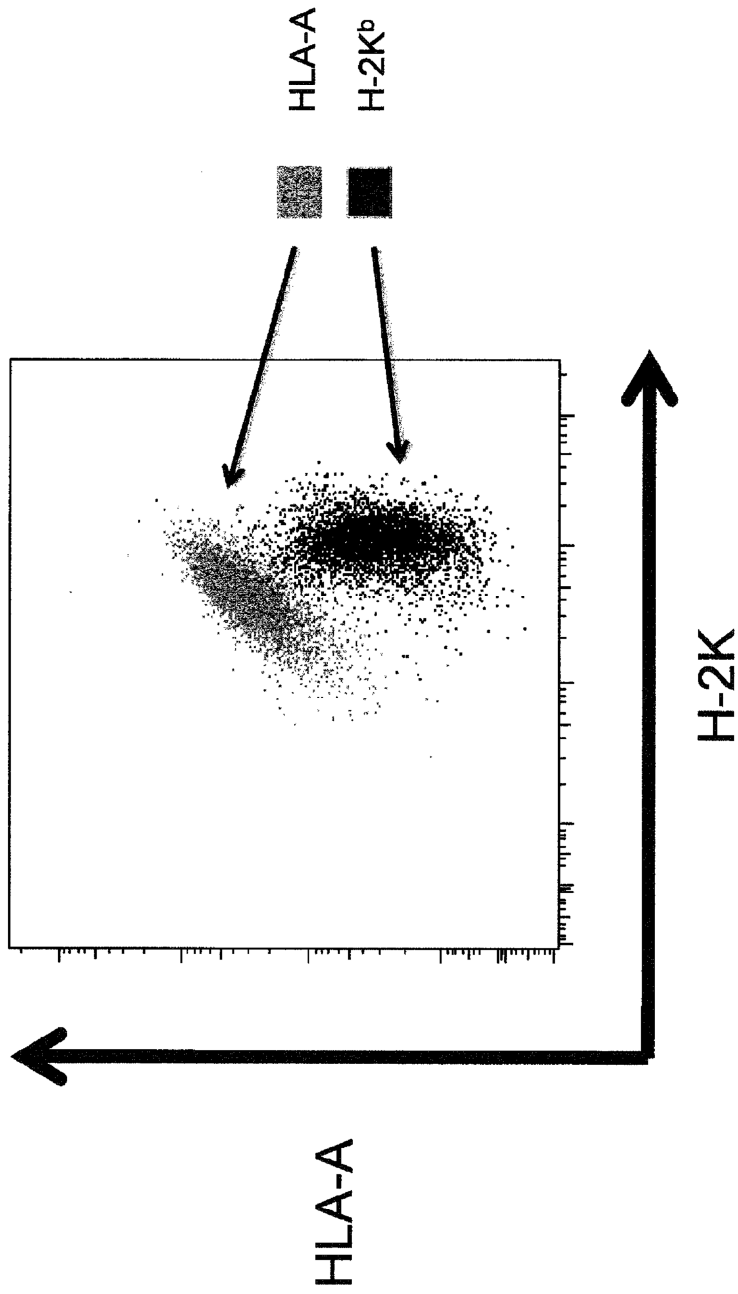


FIG. 6B

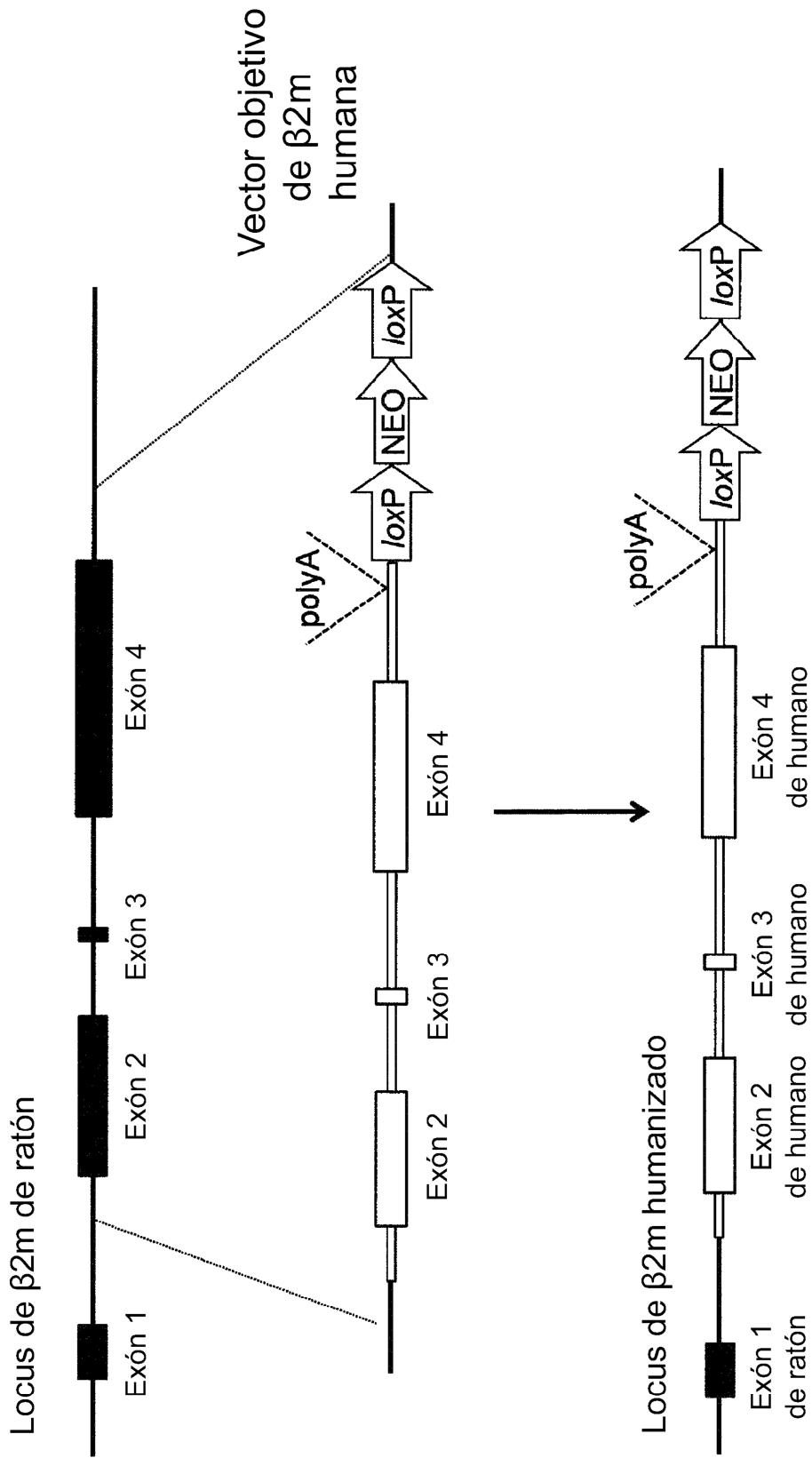


FIG. 7

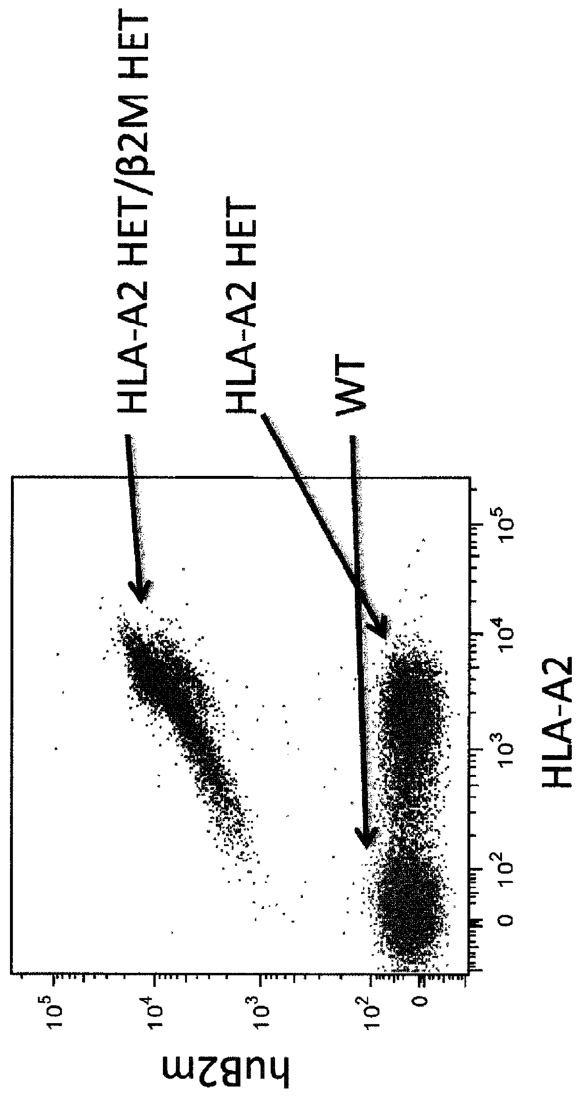


FIG. 8

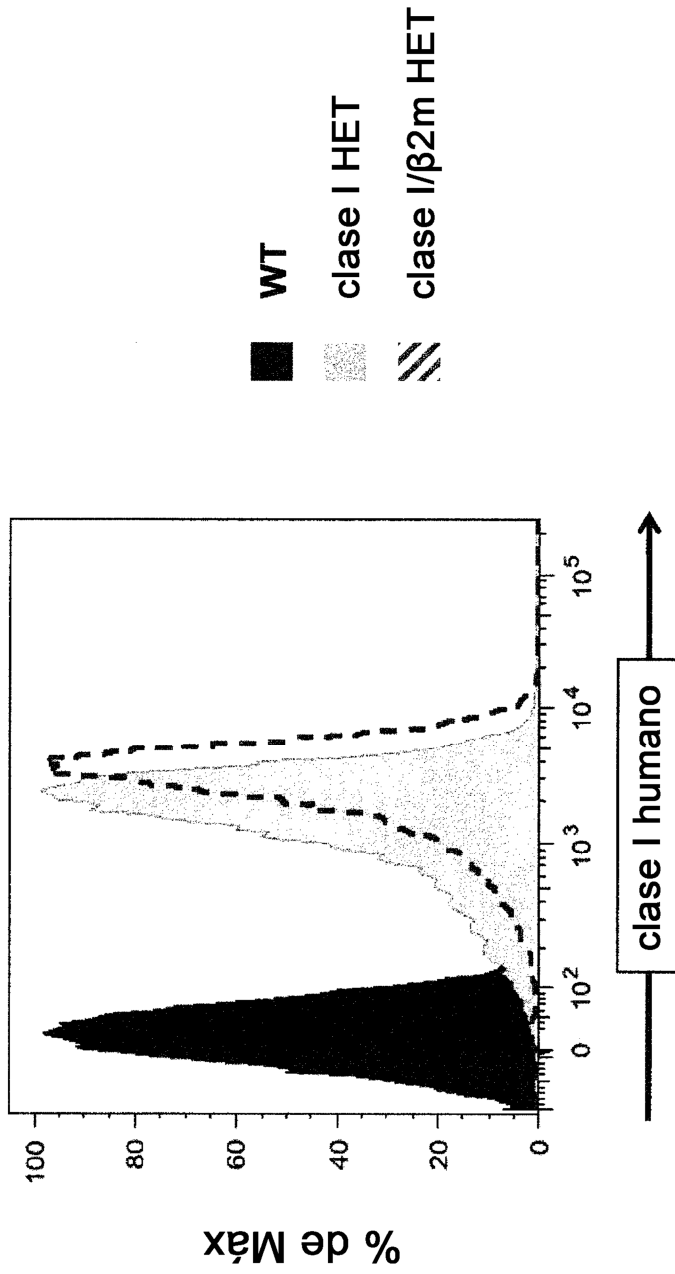


FIG. 9

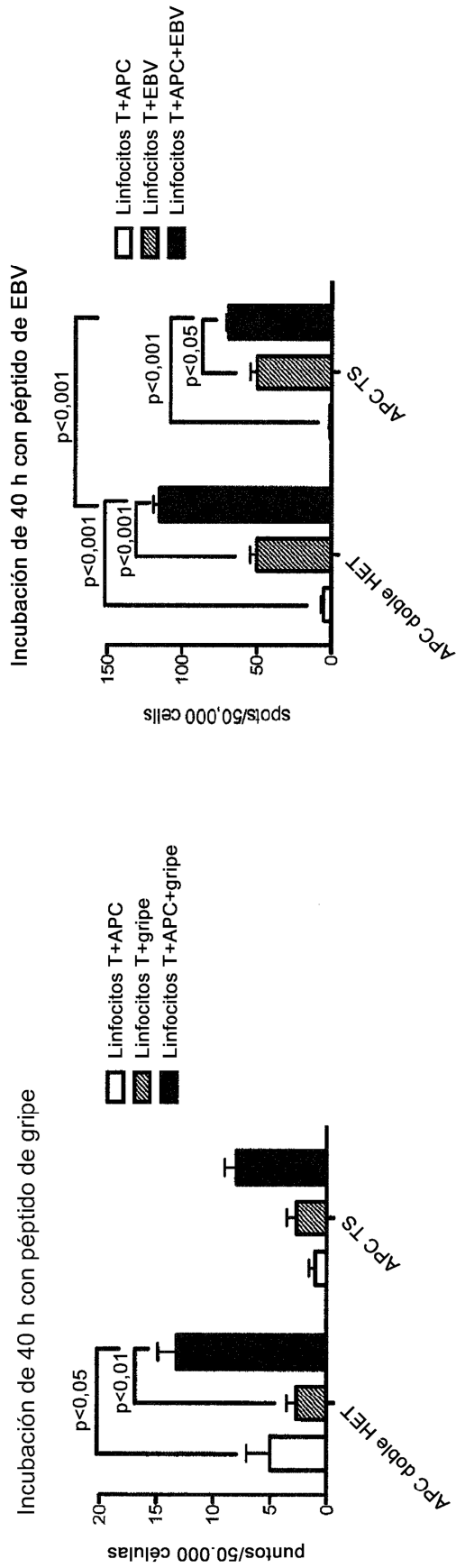


FIG. 10