

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 218**

51 Int. Cl.:

C12N 15/13 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2008 E 12187787 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2602323**

54 Título: **Composiciones y procedimientos de inhibición de genes de inmunoglobulinas endógenas y de producción de anticuerpos idiotípicos humanos transgénicos**

30 Prioridad:

01.06.2007 US 941619 P

11.04.2008 US 44324 P

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

18.04.2018

73 Titular/es:

OPEN MONOCLONAL TECHNOLOGY, INC

(100.0%)

3911 Sorrento Valley Boulevard, Suite 110

San Diego, CA 92121, US

72 Inventor/es:

BUELOW, RONALD

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 664 218 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos de inhibición de genes de inmunoglobulinas endógenas y de producción de anticuerpos idiotípicos humanos transgénicos.

Resumen de la invención

- 5 La invención se refiere a animales transgénicos no humanos que tienen uno o más loci de inmunoglobulina endógena inactivados y a procedimientos de preparación de los mismos. La invención se refiere además a composiciones y procedimientos para la producción de anticuerpos humanizados y completamente humanos que usan tales animales transgénicos no humanos, y anticuerpos así producidos. Los animales humanos, las células germinales humanas, los ovocitos humanos y los embriones humanos no están incluidos en el alcance de la invención. De acuerdo con lo anterior, la siguiente descripción se debe leer como que excluye tal sujeto humano del alcance de la protección.

Antecedentes de la invención

Los anticuerpos son una clase importante de productos farmacéuticos que se han utilizado con éxito en el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones humanas, incluidas enfermedades infecciosas, cáncer, enfermedades alérgicas y enfermedad injerto contra huésped, así como en la prevención del rechazo de trasplantes.

- 15 Un problema asociado con la aplicación terapéutica de inmunoglobulinas no humanas es la posible inmunogenicidad de estas en pacientes humanos. Con el fin de reducir la inmunogenicidad de tales preparaciones, se han desarrollado diversas estrategias para la producción de anticuerpos parcialmente humanos (humanizados) y completamente humanos. La capacidad de producir anticuerpos transgénicos que tienen un idiotipo humano en animales no humanos es particularmente deseable ya que los determinantes de unión a antígeno se encuentran dentro de la región idiotipo, y se cree que los idiotipos no humanos contribuyen a la inmunogenicidad de los agentes terapéuticos de anticuerpos actuales. El idiotipo humano es una consideración especialmente importante con respecto a los agentes terapéuticos de anticuerpos monoclonales, que consiste en un solo idiotipo liberado a una concentración relativamente alta en oposición a la variedad de idiotipos administrados a concentraciones más bajas por una mezcla de anticuerpos policlonales.

- 20 Aunque se han descrito varios enfoques para producir anticuerpos transgénicos humanizados en animales no humanos, un problema importante que se encuentra en muchos de estos enfoques es la producción de anticuerpos endógenos, ya sea preferentemente o en combinación con anticuerpos transgénicos en el animal huésped. Se han usado diversos esquemas de clonación recombinantes en intentos de alterar la producción endógena de inmunoglobulinas en animales huésped para abordar este problema. Sin embargo, la inactivación funcional de los genes de inmunoglobulinas presenta muchos obstáculos en muchas especies de vertebrados.

- 25 Por ejemplo, aunque se han producido con éxito ratones mutantes homocigóticos con loci JH suprimido usando recombinación homóloga, las ES u otras células pluripotentes sostenibles en las que se puede realizar la recombinación homóloga para inactivar loci endógenos no están fácilmente disponibles en la mayoría de las especies de vertebrados.

- Además, las mutaciones que interfieren con la expresión de la superficie celular pero no con la reordenación productiva de los segmentos génicos de VDJ o VJ de inmunoglobulina son insuficientes para inactivar por completo la expresión de Ig endógena. Esto se ejemplifica por el hecho de que los ratones mutantes homocigotos con un exón de membrana alterado de la cadena pesada μ (denominados ratones μ MT) no pueden producir IgM o IgG, pero aún producen cantidades significativas de IgA (Macpehrson et al. Nature Immunol 2(7):625-631 (2001). Además, el suero de ratones heterocigotos mutantes contiene IgM e IgG codificados por ambos alelos, el alelo de tipo salvaje y el alelo μ MT mutado (Kitamura and Rajewky, Nature 356:154-156 (1992). Esto se debe al hecho de que la primera reorganización en el curso del desarrollo de las células B es la unión de segmentos génicos DH y JH en ambos cromosomas homólogos, generando una célula pro-B. Si, en los ratones μ MT/+, una célula pro B se somete posteriormente a la unión VH-DHJH en el locus de IgH mutado primero y la unión está en marco ("productiva"), la célula pre-B resultante puede expresar una cadena μ de la forma secretada, pero no puede expresar la μ unida a la membrana. Puesto que se requiere la expresión de μ unida a la membrana para la exclusión alélica, dicha célula todavía puede experimentar la unión de VH-DHJH en el locus de IgH de tipo salvaje; y si esta segunda reordenación también es productiva, la célula expresa dos cadenas μ diferentes, una de las cuales está unida a la membrana. El suero de tales ratones contiene IgM derivado de ambos alelos. Además, la IgG derivada de ambos alelos se puede encontrar en el suero de tales ratones porque la conmutación a menudo se induce concomitantemente en ambos loci IgH de una célula B.

- 35 La exclusión alélica incompleta también se observa en animales con loci de inmunoglobulina transgénica funcional y loci de inmunoglobulina endógena mutados que aún pueden reordenar los segmentos génicos VDJ o VJ productivamente. Una V-DHJH que reordena las células B en uno o en ambos loci endógenos mutados puede reordenar los loci de inmunoglobulina transgénica de manera productiva. Dicha célula B expresa la inmunoglobulina transgénica unida a la membrana y se desarrolla en una célula B madura. Durante el desarrollo de células B, el cambio de isotipo en el locus endógeno mutado puede dar como resultado una inmunoglobulina endógena que expresa las células B. De acuerdo con lo anterior, tales mutaciones son insuficientes para la inactivación completa de la expresión de inmunoglobulina endógena en animales con loci de inmunoglobulina transgénica.

El documento WO 2004/067736 describe procedimientos para alteraciones del ADN cromosómico para uso en la manipulación del genoma, que incluyen, por ejemplo, el uso de una meganucleasa en la introducción de transgenes.

Mendez et al (Nature Genetics Vol. 15, p146-156 1997) describen el trasplante de loci de Ig de megabases humanas en ratones inactivados con Ig y la producción de anticuerpos humanos resultante en dichos ratones.

- 5 Porteus et al (Nature Biotechnology Vol. 23, No. 8 p967, 2005) revisan la dirección de genes en genomas de mamíferos y la utilidad de las nucleasas con dedos de zinc en el aumento de las eficacias de direccionamiento.

Resumen de la invención

10 Un problema principal asociado con la producción de anticuerpos transgénicos humanizados en animales no humanos ha sido la producción o coproducción preferencial de anticuerpos endógenos en el huésped. La presente invención resuelve este problema proporcionando procedimientos para la producción de animales transgénicos que albergan al menos un locus de Ig artificial y carecen de la capacidad de producir inmunoglobulina endógena. Estos animales son muy útiles para la producción de anticuerpos transgénicos humanizados y completamente humanos. Los procedimientos usados para generar tales animales transgénicos son efectivos en muchas especies, incluyendo especies a partir de las cuales las células ES o las células pluripotentes sostenibles no están actualmente disponibles fácilmente y en las que la recombinación homóloga y la desactivación génica no se realizan fácilmente.

15 La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que una meganucleasa se puede usar para ablación funcional de loci de inmunoglobulina endógena para generar animales transgénicos útiles para la producción de anticuerpos transgénicos humanizados y completamente humanos. Además, se pueden usar dos meganucleasas distintas que se dirigen a sitios genómicos distintos para eliminar efectivamente una gran porción de un locus de inmunoglobulina (hasta varios kb), asegurando así la inactivación completa del locus y garantizando además que los animales transgénicos portadores de la mutación germinal no generen ninguna célula B capaz de la producción endógena de inmunoglobulinas.

20 De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la integración dirigida de un locus de Ig artificial en una célula no humana receptora que comprende: introducir en una célula no humana receptora una meganucleasa específica de sitio dirigida a un locus de Ig endógeno y un vector transgénico que comprende un locus de Ig artificial de manera que el locus de Ig artificial se integra en el genoma de la célula no humana receptora mediante integración dirigida y reemplaza el locus de Ig endógeno, o partes del mismo, mediante recombinación homóloga; en el que la meganucleasa aumenta la frecuencia de la recombinación homóloga a través de la escisión del ADN de doble cadena.

25 En otro aspecto, se proporciona un animal transgénico no humano, que se puede obtener del procedimiento descrito que comprende: i) seleccionar una célula en la que los vectores transgénicos se han integrado en el genoma en el sitio dirigido; ii) inyectar la célula seleccionada en un embrión no humano en desarrollo o; iii) cultivar la célula resultante en un medio apropiado y transferirla a un receptor sincronizado para generar un animal transgénico no humano, en el que el animal comprende: i) al menos un construcción de expresión de meganucleasa genómica regulable; y ii) un loci artificial de Ig, iii) en el que el animal es capaz de producir un anticuerpo que tiene un idiotipo humano.

30 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo derivado del animal que se selecciona de un ave, un roedor y una comadreja, en el que el anticuerpo comprende una región Fc de rata y en el que el anticuerpo tiene un idiotipo humano.

35 En otro aspecto, se proporciona el uso de un vector transgénico para integración dirigida, en el que el vector transgénico comprende una región de control de la expresión inducible unida operativamente a un ácido nucleico que codifica una meganucleasa específica de sitio que se dirige a un locus de Ig endógeno, en el que el uso comprende: introducir el vector transgénico en una célula receptora de manera que el vector transgénico se integre en el genoma de la célula en el sitio dirigido mediante recombinación homóloga; introducir un vector transgénico que comprende un locus artificial en la célula receptora de manera que el locus artificial se integra en el genoma de la célula receptora mediante integración dirigida.

40 Los animales usados en la invención son pequeños animales de laboratorio, particularmente aves, roedores y comadrejas. Los loci artificiales usados en la invención pueden comprender al menos un segmento génico V humano. En una realización preferida, un locus de Ig artificial comprende (i) una región V que tiene al menos un segmento génico V humano que codifica una secuencia de aminoácidos de la región V humana hipermutada o la línea germinal; (ii) uno o más segmentos génicos J; y (iii) uno o más genes de región constante, en el que el locus de Ig artificial es funcional y capaz de experimentar un reordenamiento génico y producir un repertorio de inmunoglobulinas en el animal transgénico.

45 En una realización, el animal transgénico comprende un locus de cadena pesada de Ig endógeno inactivado. En una realización preferida, el animal transgénico tiene ambos loci de cadena pesada de Ig endógeno inactivado como, de acuerdo con lo anterior, no porta un locus de cadena pesada de Ig endógeno funcional.

50 En una realización, el animal transgénico comprende un locus de cadena ligera de Ig endógeno inactivado. En una realización preferida, el animal transgénico tiene tanto loci de cadena ligera de Ig endógenos inactivados como, de acuerdo con lo anterior, no lleva un locus de cadena ligera de Ig endógeno funcional.

- En una realización preferida, el animal transgénico carece de un locus de cadena pesada de Ig endógeno funcional y un locus de cadena ligera de Ig funcional.
- 5 En una realización, el animal transgénico comprende al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial. En una realización, el animal transgénico carece de un locus de cadena ligera de Ig funcional y comprende al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial.
- En una realización, el animal transgénico comprende al menos un locus de cadena ligera de Ig artificial.
- En una realización, el animal transgénico comprende al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial y al menos un locus de cadena ligera de Ig artificial.
- 10 En una realización preferida, los loci de Ig artificiales son funcionales y capaces de experimentar reordenamiento génico y producir un repertorio de inmunoglobulinas en el animal transgénico, cuyo repertorio de inmunoglobulinas incluye inmunoglobulinas que tienen un idiotipo humano.
- 15 En una realización, uno o más genes de región constante de los loci de Ig artificiales comprenden al menos un gen de región constante no humana y son funcionales y capaces de experimentar reordenamiento génico y producir un repertorio de inmunoglobulinas quiméricas en el animal transgénico, cuyo repertorio de inmunoglobulinas quiméricas incluye inmunoglobulinas quiméricas que tienen un idiotipo humano.
- En una realización, uno o más genes de región constante de los loci de Ig artificiales comprenden al menos un gen de región constante humana y son funcionales y capaces de experimentar reordenamiento génico y producir un repertorio de inmunoglobulinas en el animal transgénico, cuyo repertorio de inmunoglobulinas incluye inmunoglobulinas que tienen un idiotipo humano y una región constante humana.
- 20 En un aspecto, la invención proporciona descendientes de animales transgénicos de la invención. En una realización preferida, los descendientes comprenden al menos un locus de Ig artificial y tienen al menos un locus de Ig endógeno inactivado en la línea germinal.
- En un aspecto, la invención proporciona animales transgénicos capaces de generar células germinales viables que tienen al menos un locus de Ig endógeno que está inactivado.
- 25 En una realización, tales animales transgénicos comprenden una construcción de expresión de meganucleasa genómica, preferiblemente una construcción que tiene una región de control de expresión inducible unida operativamente a un ácido nucleico que codifica una meganucleasa, en la que la meganucleasa codificada reconoce una secuencia diana de meganucleasa presente en o próxima a un locus de Ig endógeno del animal transgénico.
- 30 Cuando el animal transgénico es sexualmente maduro y comprende células germinales viables, y la construcción de expresión de meganucleasa genómica se puede usar para inactivar el locus de Ig endógeno dirigido en tales células germinales, in vitro o in vivo, sin comprometer la viabilidad de estas, asegurando que los animales F1 que portan una mutación de línea germinal en un locus de Ig se pueden derivar de allí.
- En una realización, el animal transgénico comprende además al menos un locus de Ig artificial.
- 35 En un aspecto, la divulgación proporciona animales transgénicos que comprenden células germinales viables en las que se inactiva al menos un locus de Ig endógeno. En una realización, el animal transgénico comprende además al menos un locus de Ig artificial.
- En una realización, la invención proporciona procedimientos de producción de animales transgénicos que comprenden al menos un locus de Ig artificial y que tienen al menos un locus de Ig endógeno inactivado en la línea germinal. En una realización preferida, el animal transgénico es nulicigótico para la cadena ligera de Ig endógena y/o la cadena pesada de Ig endógena.
- 40 Preferiblemente, un locus de Ig endógeno se inactiva en una célula germinal parental, o la célula germinal de un predecesor, por expresión de una meganucleasa en la misma. Los procedimientos comprenden producir una meganucleasa en la célula germinal, en el que la meganucleasa reconoce una secuencia diana de meganucleasa presente en o próxima a un locus de Ig endógeno e inactiva selectivamente el locus de Ig dirigido en la célula germinal produciendo así una célula germinal viable que tiene al menos un locus de Ig endógeno inactivado. Tal célula germinal que tiene al menos un locus de Ig endógeno inactivado se usa para producir un animal que tiene al menos un locus de Ig endógeno inactivado en la línea germinal. En una realización, la célula germinal, o aquella con la que se combina, comprende al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial. En una realización, la célula germinal, o aquella con la que se combina, comprende al menos un locus de cadena ligera de Ig artificial. En una realización, la célula germinal, o aquella con la que se combina, comprende al menos un locus de cadena ligera de Ig artificial y al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial.
- 45 En una realización, los procedimientos implican introducir una construcción de expresión de meganucleasa o un ácido nucleico que codifica la meganucleasa en la célula germinal.
- 50

- 5 En una realización preferida, la célula germinal comprende una construcción de expresión de meganucleasa genómica, que comprende una región de control de la expresión unida operativamente a un ácido nucleico que codifica la meganucleasa. En una realización preferida, la célula germinal comprende una construcción de expresión de meganucleasa genómica inducible y los procedimientos implican inducir la expresión del ácido nucleico que codifica la meganucleasa en la célula germinal. En una realización, los procedimientos implican repetir la etapa de inducir la expresión del ácido nucleico que codifica la meganucleasa en la célula germinal. En una realización, la inducción se realiza in vivo. En otra realización, la inducción se realiza in vitro. En una realización, la célula germinal comprende una construcción de expresión de meganucleasas genómicas, que comprende una región de control de la expresión que exhibe actividad específica de células germinales.
- 10 Las células germinales resultantes se pueden usar para generar un animal F1 que tiene al menos un locus de Ig endógeno inactivado en la línea germinal. El animal F1 puede comprender uno o más loci de Ig artificiales o se puede cruzar para generar dichos animales que comprenden al menos un locus de Ig artificial.
- 15 En una realización alternativa, el procedimiento implica introducir una construcción de expresión de meganucleasa o ácido nucleico que codifica una meganucleasa en un ovocito fertilizado o embrión y generar una célula germinal viable que tiene al menos un locus de Ig inactivado en el animal fundador resultante. El animal fundador se puede usar para generar un animal F1 que tiene al menos un locus de Ig endógeno inactivado en la línea germinal. El animal F1 puede comprender uno o más loci de Ig artificiales o se puede cruzar para generar dichos animales que comprenden al menos un locus de Ig artificial.
- 20 En una realización, la secuencia diana de meganucleasa está presente en o próximo a un segmento génico J.
- En una realización, la secuencia diana de meganucleasa está presente en o próxima a un segmento génico de región constante de inmunoglobulina. En una realización preferida, el gen de la región constante codifica la inmunoglobulina μ .
- En una realización, los procedimientos implican cribado de células germinales para la viabilidad y la inactivación de un locus de Ig endógeno. En una realización, los procedimientos implican cribado de células germinales para detectar la presencia de un locus de Ig artificial.
- 25 El cruce de animales es preferiblemente entre animales que tienen loci endógenos inactivados, para generar animales que son nullizygous para la cadena ligera de Ig endógena y/o la cadena pesada de Ig endógena.
- 30 En una realización preferida, los procedimientos comprenden además el uso de una segunda meganucleasa. La segunda meganucleasa reconoce una segunda secuencia diana de meganucleasa presente o próxima en el locus de Ig endógeno y escinde selectivamente el locus de Ig endógeno junto con la primera meganucleasa, pero en un sitio distinto al de la primera meganucleasa, inactivando así al menos un locus de Ig endógeno.
- 35 En una realización preferida, la célula germinal comprende una segunda construcción de expresión de meganucleasa genómica, que comprende una región de control de expresión unida operativamente a un segundo ácido nucleico que codifica una meganucleasa. En una realización preferida, la región de control de la expresión es una región de control de la expresión inducible, y el procedimiento comprende además inducir la expresión del segundo ácido nucleico que codifica la meganucleasa en la célula germinal, produciéndose así la segunda meganucleasa codificada y, junto con la primera meganucleasa, inactiva selectivamente el locus de Ig específico en la célula germinal. En una realización, los procedimientos implican repetir la etapa de inducir la expresión del segundo ácido nucleico que codifica la meganucleasa en la célula germinal. En una realización, la inducción se realiza in vivo. En una realización, la inducción se realiza in vitro. En una realización, la segunda construcción de expresión de meganucleasa genómica comprende una región de control de la expresión que exhibe actividad específica de células germinales.
- 40 En una realización alternativa, los procedimientos implican la introducción de una segunda construcción de expresión de meganucleasas o un segundo ácido nucleico que codifica la meganucleasa en la célula germinal.
- 45 En una realización alternativa, los procedimientos implican introducir una segunda construcción de expresión de meganucleasa o un segundo ácido nucleico que codifica una meganucleasa en un ovocito fertilizado o embrión y generar una célula germinal viable que tiene al menos un locus de Ig inactivado en el animal fundador resultante. El animal fundador se puede usar para generar un animal F1 que tiene al menos un locus de Ig endógeno inactivado en la línea germinal. El animal F1 puede comprender uno o más loci de Ig artificiales o se puede cruzar para generar tales animales que comprenden al menos un locus de Ig artificial.
- 50 En una realización preferida, las meganucleasas primera y segunda se dirigen a segmentos génicos J. En una realización, la primera y segunda secuencias diana de meganucleasa son, tomadas juntas, aguas arriba y aguas abajo de uno o más segmentos génicos J dentro del locus de Ig endógeno, y la escisión por la primera y segunda meganucleasas codificadas produce la supresión de un segmento de ADN genómico que comprende el uno o más segmentos génicos J
- 55 En otra realización, la primera y la segunda meganucleasas se dirigen a segmentos génicos de la región constante. En una realización, la primera y segunda secuencias diana de meganucleasa son, tomadas juntas, aguas arriba y aguas abajo de uno o más segmentos génicos de la región constante de inmunoglobulina, y la escisión por la primera y

segunda meganucleasas codificadas produce la supresión de un segmento de ADN genómico que comprende uno o más segmentos génicos de la región constante de inmunoglobulina. En una realización preferida, el gen de la región constante codifica la inmunoglobulina μ .

5 En los procedimientos en este documento, los loci artificiales usados comprenden al menos un segmento génico V humano. En una realización preferida, un locus de Ig artificial comprende (i) una región V que tiene al menos un segmento génico V humano que codifica una secuencia de aminoácidos de la región V humana hipermutada o la línea germinal; (ii) uno o más segmentos génicos J; y (iii) uno o más genes de región constante, en el que el locus de Ig artificial es funcional y capaz de experimentar un reordenamiento génico y producir un repertorio de inmunoglobulinas en el animal transgénico.

10 En una realización, se incorpora al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial en el genoma de un animal transgénico de la divulgación. En una realización, el animal transgénico carece de un locus de cadena ligera de Ig funcional.

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

15 En una realización, al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial y al menos un locus de cadena ligera de Ig artificial se incorporan en el genoma de un animal transgénico de la invención.

En una realización preferida, los loci de Ig artificiales son funcionales y capaces de experimentar reordenamiento génico y producir un repertorio de inmunoglobulinas en el animal transgénico, cuyo repertorio de inmunoglobulinas incluye inmunoglobulinas que tienen un idiotipo humano.

20 En una realización, uno o más genes de región constante de los loci de Ig artificiales comprenden al menos un gen de región constante no humana y son funcionales y capaces de experimentar reordenamiento génico y producir un repertorio de inmunoglobulinas quiméricas en el animal transgénico, cuyo repertorio de inmunoglobulinas quiméricas incluye inmunoglobulinas quiméricas que tienen un idiotipo humano.

25 En una realización, uno o más genes de región constante de los loci de Ig artificiales comprenden al menos un gen de la región constante humana y son funcionales y capaces de experimentar reordenamiento génico y producir una colección de inmunoglobulinas en el animal transgénico, cuyo repertorio de inmunoglobulinas incluye inmunoglobulinas que tienen un idiotipo humano y una región constante humana.

30 En la divulgación, los procedimientos de fabricación de un animal transgénico comprenden cruzar un animal transgénico que tiene al menos un locus de Ig endógeno inactivado en la línea germinal con un segundo animal transgénico que tiene al menos un locus de Ig artificial, cuyo locus comprende (i) una región V que tiene al menos un segmento génico V humano que codifica una secuencia de aminoácidos de la región V humana hipermutada o de la línea germinal; (ii) uno o más segmentos génicos J; y (iii) uno o más genes de región constante, para producir un animal transgénico F1, en el que el animal transgénico F1 comprende el al menos un locus de Ig artificial del segundo animal transgénico, y en el que el locus de Ig artificial del segundo animal transgénico es funcional y capaz de experimentar un reordenamiento génico y producir un repertorio de inmunoglobulinas en el animal transgénico F1. El cruce se puede hacer mediante la cría de animales o mediante la combinación de otros gametos, incluidas las manipulaciones in vitro.

35 Opcionalmente, el segundo animal transgénico comprende al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial.

Opcionalmente, el segundo animal transgénico comprende al menos un locus de cadena ligera de Ig artificial.

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

45 Opcionalmente, el segundo animal transgénico comprende al menos dos loci de Ig artificiales, que incluyen al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial y al menos un locus de cadena ligera de Ig artificial. Opcionalmente, los loci de Ig artificiales del segundo animal transgénico son funcionales y capaces de experimentar reordenamiento génico y producir un repertorio de inmunoglobulinas en el animal transgénico F1, cuyo repertorio de inmunoglobulinas incluye inmunoglobulinas que tienen un idiotipo humano. Opcionalmente, uno o más genes de región constante de los loci de Ig artificiales del segundo animal transgénico comprenden al menos un gen de región constante no humana y son funcionales y capaces de experimentar reordenamiento génico y producir un repertorio de inmunoglobulinas quiméricas en el animal transgénico F1, cuyo repertorio de inmunoglobulinas quiméricas incluye inmunoglobulinas quiméricas que tienen un idiotipo humano. Opcionalmente, uno o más genes de región constante de los loci de Ig artificiales del segundo animal transgénico comprenden al menos un gen de región constante humana y son funcionales y capaces de experimentar reordenamiento génico y producir un repertorio de inmunoglobulinas en el animal transgénico F1, cuyo repertorio de las inmunoglobulinas incluyen inmunoglobulinas que tienen un idiotipo humano y una región constante humana.

55

De manera similar, en la divulgación, los procedimientos comprenden cruzar un segundo animal transgénico que tiene al menos un locus de Ig artificial con un animal transgénico de la invención que es capaz de generar una célula germinal viable que tiene al menos un locus de Ig endógeno que está inactivado. Opcionalmente, el segundo animal transgénico comprende al menos dos loci de Ig artificiales, que incluyen al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial y al menos un locus de cadena ligera de Ig artificial.

Opcionalmente, los procedimientos comprenden introducir al menos un locus de Ig artificial en una célula germinal que tiene al menos un locus de Ig endógeno que ha sido, o puede ser inactivado por la actividad de una o más meganucleasas, en el que el al menos un locus de Ig artificial comprende (i) una región V que tiene al menos un segmento génico V humano que codifica una secuencia de aminoácidos de la región V humana hipermutada o la línea germinal; (ii) uno o más segmentos génicos J; y (iii) uno o más genes de región constante, en los que el locus de Ig artificial es funcional y capaz de experimentar reordenamiento génico y producir un repertorio de inmunoglobulinas artificiales en un animal transgénico derivado de la célula germinal. Los procedimientos comprenden además derivar un animal transgénico F1 que comprende al menos un locus de Ig artificial y que tiene al menos un locus de Ig endógeno inactivado en la línea germinal que ha sido inactivado por la acción de una o más meganucleasas de la célula germinal así producida.

Opcionalmente, el al menos un locus de Ig artificial incluye al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial.

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

Opcionalmente, el al menos un locus de Ig artificial incluye al menos un locus de cadena ligera de Ig artificial.

Opcionalmente, se introducen al menos dos loci artificiales en la célula germinal, que incluyen al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial y al menos un locus de cadena ligera de Ig artificial. Opcionalmente, los loci de Ig artificiales son funcionales y capaces de experimentar reordenamiento génico y producir un repertorio de inmunoglobulinas en el animal transgénico F1 derivado, cuyo repertorio de inmunoglobulinas incluye inmunoglobulinas que tienen un idiotipo humano. Opcionalmente, uno o más genes de región constante de los loci de Ig artificiales comprenden al menos un gen de región constante no humana y son funcionales y capaces de experimentar reordenamiento génico y producir un repertorio de inmunoglobulinas quiméricas en el animal transgénico F1 derivado, cuyo repertorio de inmunoglobulinas quiméricas incluye inmunoglobulinas quiméricas que tienen un idiotipo humano. Opcionalmente, uno o más genes de región constante de los loci de Ig artificiales comprenden al menos un gen de región constante humana y son funcionales y capaces de experimentar reordenamiento génico y producir un repertorio de inmunoglobulinas en el animal transgénico F1 derivado., cuyo repertorio de inmunoglobulinas incluye inmunoglobulinas que tienen un idiotipo humano y una región constante humana.

En una realización, los procedimientos implican el cribado de células germinales para la viabilidad y la inactivación de un locus de Ig endógeno. En una realización, los procedimientos implican el cribado de células germinales para detectar la presencia de un locus de Ig artificial.

En una realización, los procedimientos comprenden introducir al menos un locus de Ig artificial en un ovocito fertilizado o embrión derivado de una célula germinal que tiene al menos un locus de Ig endógeno que ha sido inactivado, o se puede inactivar, mediante la acción de una o más meganucleasas, en los que al menos un locus de Ig artificial comprende (i) una región V que tiene al menos un segmento génico V humano que codifica una secuencia de aminoácidos de la región V humana hipermutada o de la línea germinal; (ii) uno o más segmentos génicos J; y (iii) uno o más genes de región constante, en los que el locus de Ig artificial es funcional y capaz de experimentar reordenamiento génico y producir un repertorio de inmunoglobulinas artificiales en el animal transgénico fundador, o un descendiente del mismo, derivado del ovocito fertilizado o embrión. Los procedimientos comprenden además derivar del ovocito fertilizado o embrión el animal transgénico fundador, y opcionalmente el descendiente del mismo, para producir un animal transgénico que comprende al menos un locus de Ig artificial y que tiene al menos un locus de Ig endógeno inactivado en la línea germinal que ha sido inactivado por la acción de una o más meganucleasas.

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

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

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

En una realización preferida, se introducen al menos dos loci artificiales en el ovocito fertilizado o embrión, que incluyen al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial y al menos un locus de cadena ligera de Ig artificial. En una realización, los loci de Ig artificiales son funcionales y capaces de experimentar reordenamiento génico y producir un repertorio de inmunoglobulinas en el animal transgénico fundador, o un descendiente del mismo, cuyo repertorio de inmunoglobulinas incluye inmunoglobulinas que tienen un idiotipo humano. En una realización, uno o más genes de región constante de los loci de Ig artificiales comprenden al menos un gen de región constante no humana y son funcionales y capaces de experimentar reordenamiento génico y producir un repertorio de inmunoglobulinas quiméricas

- 5 en el animal transgénico fundador, o un descendiente del mismo, cuyo repertorio de inmunoglobulinas quiméricas incluye inmunoglobulinas quiméricas que tienen un idiotipo humano. En una realización, uno o más genes de región constante de los loci de Ig artificiales comprenden al menos un gen de región constante humana y son funcionales y capaces de experimentar reordenamiento génico y producir un repertorio de inmunoglobulinas en el animal transgénico fundador, o un descendiente del mismo, cuyo repertorio de inmunoglobulinas incluye inmunoglobulinas que tienen un idiotipo humano y una región constante humana.
- 10 En un aspecto, la divulgación proporciona procedimientos de producción de animales transgénicos capaces de generar una célula germinal viable en la que al menos un locus de Ig endógeno está inactivado. Opcionalmente, los procedimientos comprenden generar un animal transgénico que tiene una construcción de expresión de meganucleasas genómicas, en los que la construcción de expresión comprende una región de control de la expresión unida operativamente a un ácido nucleico que codifica la meganucleasa. Opcionalmente, la construcción es una construcción de expresión de meganucleasa genómica inducible que se puede inducir para expresar el ácido nucleico que codifica la meganucleasa en una célula germinal
- 15 La divulgación de la invención proporciona procedimientos de producción de un animal transgénico que tiene una célula germinal viable en la que al menos un locus de Ig endógeno está inactivado. Los procedimientos comprenden inactivar el locus de Ig endógeno en la célula germinal, o en una célula germinal parental o un ovocito fertilizado o un embrión derivado del mismo, mediante la expresión de una meganucleasa en el mismo.
- 20 La divulgación también se refiere a una célula germinal viable en la que al menos un locus de Ig endógeno se puede inactivar. Opcionalmente, la célula germinal comprende una construcción de expresión de meganucleasas genómicas, en la que la construcción de expresión comprende una región de control de expresión unida operativamente a un ácido nucleico que codifica una meganucleasa. Opcionalmente, la construcción es una construcción de expresión de meganucleasa genómica inducible que se puede inducir para expresar el ácido nucleico que codifica la meganucleasa en una célula germinal.
- Opcionalmente, la célula germinal comprende al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial.
- 25 Opcionalmente, la célula germinal comprende al menos un locus de cadena ligera de Ig artificial.
- Opcionalmente, la célula germinal comprende al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial y al menos un locus de cadena ligera de Ig artificial.
- Opcionalmente, la divulgación proporciona una célula germinal viable en la que al menos un locus de Ig endógeno está inactivado.
- 30 Opcionalmente, la célula germinal comprende al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial.
- Opcionalmente, la célula germinal comprende al menos un locus de cadena ligera de Ig artificial.
- Opcionalmente, la célula germinal comprende al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial y al menos un locus de cadena ligera de Ig artificial.
- 35 La divulgación proporciona procedimientos de producción de una célula germinal viable que tiene al menos un locus de Ig endógeno inactivado. Los procedimientos implican expresar al menos una meganucleasa en una célula germinal, un ovocito fertilizado o un embrión, para generar una célula germinal viable que tiene al menos un locus de Ig endógeno inactivado. La meganucleasa así expresada reconoce una secuencia diana de meganucleasa presente en o próxima a dicho locus de Ig endógeno.
- 40 Opcionalmente, la meganucleasa se expresa en una célula germinal, la célula germinal en la que se expresa la meganucleasa produce una célula germinal viable que tiene al menos un locus de Ig endógeno inactivado. Alternativamente, se puede obtener una célula germinal viable que tiene al menos un locus de Ig endógeno inactivado a partir de un animal derivado de la célula germinal en la que se expresó la meganucleasa.
- 45 Opcionalmente, en el que la meganucleasa se expresa en un ovocito fertilizado o embrión, la célula germinal viable que tiene al menos un locus de Ig endógeno inactivado se puede obtener a partir de un animal derivado del ovocito fertilizado o embrión en el que se expresó la meganucleasa.
- Opcionalmente, el al menos un locus de Ig endógeno se inactiva in vitro. En una realización, el al menos un locus de Ig endógeno se inactiva in vivo.
- 50 La célula germinal comprende además al menos un locus de Ig artificial. En una realización, el al menos un locus de Ig artificial incluye al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial. En una realización, el al menos un locus de Ig artificial incluye al menos un locus de cadena ligera de Ig artificial.
- Opcionalmente, se introducen al menos dos loci de Ig artificiales en la célula germinal, que incluyen al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial y al menos un locus de cadena ligera de Ig artificial.

La divulgación también proporciona anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, hibridomas y procedimientos de preparación y uso de los mismos, que se derivan de la producción de anticuerpos en los animales transgénicos descritos en la presente que llevan uno o más loci artificiales y que tienen uno o más loci de Ig endógenos inactivados por medio de la actividad meganucleasa.

- 5 En una realización, los anticuerpos son anticuerpos solamente de cadena pesada, que se producen usando animales transgénicos que carecen de un locus de cadena ligera de Ig funcional y comprenden un locus de cadena pesada artificial, conseguido por los procedimientos descritos en este documento.

- 10 También se describen procedimientos de producción de anticuerpos usando animales transgénicos proporcionados en este documento. Los procedimientos comprenden inmunizar un animal transgénico de la divulgación, cuyo animal tiene al menos un locus de Ig endógeno inactivado y porta al menos un locus de Ig artificial como se describe en este documento, con un inmunógeno. Opcionalmente, el animal transgénico es nullizygous para cadena pesada de Ig endógena y/o cadena ligera de Ig endógena y, de acuerdo con lo anterior, incapaz de producir inmunoglobulinas endógenas. Opcionalmente, el animal transgénico carece de un locus de cadena ligera de Ig funcional y comprende un locus de cadena pesada de Ig artificial.

- 15 También se describen composiciones antisueros policlonales así producidas. Los antisueros policlonales preferiblemente comprenden anticuerpos que tienen un idiotipo humano. Opcionalmente, un antisero policlonal comprende anticuerpos que consisten esencialmente en anticuerpos que tienen un idiotipo humano.

La divulgación proporciona procedimientos de producción de anticuerpos monoclonales.

- 20 Opcionalmente, los procedimientos comprenden (i) inmunizar un animal transgénico de la divulgación, cuyo animal tiene al menos un locus de Ig endógeno inactivado y porta al menos un locus de Ig artificial como se describe en este documento, con un inmunógeno; (ii) aislar una célula productora de anticuerpo monoclonal a partir del animal transgénico en los que la célula productora de anticuerpo monoclonal produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno; y (iii) usar la célula productora de anticuerpo monoclonal para producir el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno, o usar la célula productora de anticuerpo monoclonal para producir una célula de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal y usar la célula de hibridoma para producir el anticuerpo monoclonal.

- 25 Opcionalmente, los procedimientos comprenden (i) inmunizar un animal transgénico de la divulgación, cuyo animal tiene al menos un locus de Ig endógeno inactivado y porta al menos un locus de Ig artificial como se describe en este documento, con un inmunógeno; (ii) aislar una célula productora de anticuerpo monoclonal a partir del animal transgénico en el que la célula productora de anticuerpo monoclonal produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno; (iii) aislar de la célula productora de anticuerpo monoclonal un ácido nucleico de anticuerpo monoclonal que codifica el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno; y (iv) usar el ácido nucleico del anticuerpo monoclonal para producir el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno.

- 35 Opcionalmente, el anticuerpo monoclonal tiene un idiotipo humano.

En un aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos monoclonales derivados de un animal transgénico de la invención.

También se describen ácidos nucleicos aislados que codifican dichos anticuerpos monoclonales.

- 40 También se describen procedimientos de producción de anticuerpos monoclonales completamente humanos. Los procedimientos comprenden (i) inmunizar un animal transgénico de la divulgación, cuyo animal tiene al menos un locus de Ig endógeno inactivado y porta al menos un locus de Ig artificial como se describe en este documento, con un inmunógeno; (ii) aislar una célula productora de anticuerpo monoclonal a partir del animal transgénico en el que la célula productora de anticuerpo monoclonal produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno; (iii) aislar de la célula productora de anticuerpo monoclonal un ácido nucleico de anticuerpo monoclonal que codifica el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al inmunógeno; (iv) modificar el ácido nucleico del anticuerpo monoclonal para producir un ácido nucleico recombinante que codifica un anticuerpo monoclonal completamente humano; y (v) usar el ácido nucleico recombinante que codifica un anticuerpo monoclonal completamente humano para producir el anticuerpo monoclonal completamente humano codificado.

- 45 En un aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos monoclonales completamente humanos producidos por un animal transgénico de la invención.

También se describen ácidos nucleicos recombinantes que codifican anticuerpos monoclonales completamente humanos, y procedimientos de producción de los mismos.

También se describe que un inmunógeno usado en los procedimientos en este documento comprende un organismo causante de enfermedad o una porción antigénica del mismo.

- Opcionalmente, un inmunógeno usado en los procedimientos en este documento es un antígeno endógeno para humanos. Opcionalmente, un inmunógeno usado en los procedimientos en este documento es un antígeno exógeno para humanos.
- 5 También se describen procedimientos para neutralizar o modular la actividad de una entidad antigénica en un componente del cuerpo humano. Opcionalmente, los procedimientos comprenden poner en contacto el componente corporal con una composición antisuero policlonal de la divulgación en la que la composición antisuero policlonal comprende moléculas de inmunoglobulina que se unen específicamente y neutralizan o modulan la actividad de la entidad antigénica.
- 10 Opcionalmente, los procedimientos comprenden poner en contacto el componente del cuerpo con un anticuerpo monoclonal de la invención, donde el anticuerpo monoclonal se une específicamente y neutraliza o modula la actividad de la entidad antigénica.
- Opcionalmente, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal completamente humano.
- Opcionalmente, la entidad antigénica es de un organismo que causa una enfermedad infecciosa.
- Opcionalmente, la entidad antigénica es una molécula de superficie celular.
- 15 Opcionalmente, la entidad antigénica es una citoquina humana o una quimioquina humana.
- Opcionalmente, la entidad antigénica es una molécula de superficie celular en una célula cancerosa maligna.
- También se describen células derivadas de animales transgénicos de la invención.
- Opcionalmente, las células se derivan del bazo de animales transgénicos de la invención.
- 20 También se describen células B derivadas de animales transgénicos de la invención, cuyas células B son capaces de producir anticuerpos que tienen un idiotipo humano.
- También se describen células germinales derivadas de animales transgénicos de la invención.
- También se describen procedimientos de preparación de hibridomas capaces de producir anticuerpos que tienen un idiotipo humano. Los procedimientos comprenden el uso de células derivadas de animales transgénicos de la invención.
- También se describen hibridomas así producidos.
- 25 En un aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos que tienen un idiotipo humano, cuyos anticuerpos se producen mediante un procedimiento de la invención.
- En un aspecto, la divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención, cuyo anticuerpo tiene un idiotipo humano.
- 30 También se describen procedimientos de tratamiento de a un paciente que necesita tratamiento, que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la divulgación al paciente.
- Breve descripción de los dibujos
- La figura 1 muestra una representación esquemática de una cadena pesada artificial que consiste en una región V, D y J humana, un potenciador intrónico de rata y varios genes de región constante artificial. Los genes de la región constante artificial contienen exones que codifican un dominio CH1 humano y dominios CH2, 3 y 4 de rata. Las secuencias polipeptídicas citoplásmicas y de expansión de membrana están codificadas por exones de rata.
- 35 Figura 2. Esquema de la interacción de I-SceI y ADN en el extremo 3' de la secuencia de reconocimiento.
- Figura 3. Esquema de la interacción del extremo 5' de la secuencia de reconocimiento I-SceI con I-SceI.
- Figura 4, Esquema del mecanismo de reconocimiento de secuencia de I-CreI (de *Nucleic Acids Res.*, 34, 4791-4800).
- Figura 5. Diagrama esquemático de la estrategia para alterar la secuencia de reconocimiento de I-CreI.
- 40 Figura 6. Proteínas de dedos de zinc (ZFP) diseñadas contra secuencias que codifican IgM de rata se expresaron en células, se preparó ADN cromosómico y la región apropiada del locus de IgM se amplificó por PCR. Los productos de reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. La figura muestra un ejemplo típico que demuestra la actividad de escisión.

Descripción detallada de la invención

Por "locus de inmunoglobulina artificial" se entiende un locus de inmunoglobulina que comprende fragmentos de loci de inmunoglobulina humana y no humana, que incluyen segmentos génicos de inmunoglobulina múltiples, que incluyen al menos un segmento génico de región variable (V), uno o más segmentos génicos J, uno o más segmentos génicos D en el caso de un locus de cadena pesada, y uno o más segmentos génicos de región constante. En la presente divulgación, al menos uno de los segmentos génicos V codifica una secuencia de aminoácidos de la región V humana hipermutada o de la línea germinal. En una realización preferida, un locus de inmunoglobulina artificial de la divulgación es funcional y capaz de reordenamiento y producción de un repertorio de inmunoglobulinas. En una realización preferida, al menos un segmento génico D es un segmento génico D humano. El "locus de Ig artificial" como se usa en este documento se puede referir a loci no reordenados, loci parcialmente reordenados y loci reordenados. Los loci de Ig artificiales incluyen loci de cadena ligera de Ig artificiales y loci de cadena pesada de Ig artificiales. En una realización, un locus de Ig artificial comprende un gen de región C no humana y es capaz de producir un repertorio de inmunoglobulinas que incluyen inmunoglobulinas quiméricas que tienen una región C no humana. En una realización, un locus de Ig artificial comprende un gen de región C humana y es capaz de producir un repertorio de inmunoglobulinas que incluyen inmunoglobulinas que tienen una región C humana. En una realización, un locus de Ig artificial comprende un "gen de región constante artificial", lo que significa un gen de región constante que comprende secuencias de nucleótidos derivadas de genes de regiones constantes humanas y no humanas. Por ejemplo, un gen de región constante C artificial de ejemplo es un gen de región constante que codifica un dominio CH1 de IgG humana y un dominio CH2 y CH3 de IgG de rata.

En algunas realizaciones, un locus de cadena pesada de Ig artificial carece de CH1, o una secuencia equivalente que permite que la inmunoglobulina resultante evite la asociación típica de inmunoglobulina: acompañante. Tales loci artificiales proporcionan la producción de anticuerpos solos de cadena pesada en animales transgénicos que carecen de un locus de cadena ligera de Ig funcional y, por consiguiente, no expresan una cadena ligera de Ig funcional. Tales loci de cadena pesada de Ig artificiales se usan en los procedimientos en este documento para producir animales transgénicos que carecen de un locus de cadena ligera de Ig funcional, y que comprenden un locus de cadena pesada de Ig artificial, cuyos animales son capaces de producir anticuerpos solamente de cadena pesada. Alternativamente, un locus de Ig artificial se puede manipular in situ para interrumpir CH1 o una región equivalente y generar un locus de cadena pesada de Ig artificial que proporciona la producción de anticuerpos solamente de cadena pesada. Con respecto a la producción de anticuerpos solamente de cadena pesada en ratones deficientes en cadenas ligeras, véase, por ejemplo, Zou et al., JEM, 204:3271-3283, 2007.

Por "idiotipo humano" se entiende una secuencia polipeptídica presente en un anticuerpo humano codificado por un segmento génico V de inmunoglobulina. El término "idiotipo humano" como se usa en este documento incluye secuencias tanto secuencias de origen natural de un anticuerpo humano, así como secuencias sintéticas sustancialmente idénticas al polipéptido encontrado en anticuerpos humanos de origen natural. Por "sustancialmente" se entiende que el grado de identidad de la secuencia de aminoácidos es al menos aproximadamente 85% -95%. Preferiblemente, el grado de identidad de la secuencia de aminoácidos es mayor que 90%, más preferiblemente mayor que 95%.

Por "anticuerpo quimérico" o "inmunoglobulina quimérica" se entiende una molécula de inmunoglobulina que comprende una porción de una secuencia polipeptídica de inmunoglobulina humana (o una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico de Ig humana) y una porción de una secuencia polipeptídica de inmunoglobulina no humana. Las moléculas de inmunoglobulina quiméricas de la presente divulgación son inmunoglobulinas con regiones Fc no humanas o regiones Fc artificiales, e idiotipos humanos. Tales inmunoglobulinas se pueden aislar a partir de animales de la invención que se han modificado por manipulación genética para producir moléculas de inmunoglobulina quiméricas.

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

El término "segmento génico de Ig" como se usa en este documento se refiere a segmentos de ADN que codifican diversas porciones de una molécula de Ig, que están presentes en la línea germinal de animales no humanos y humanos y que se unen en células B para formar genes de Ig reorganizados. De este modo, los segmentos génicos de Ig, como se usan en este documento, incluyen segmentos génicos V, segmentos génicos D, segmentos génicos J y segmentos génicos de la región C.

El término "segmento génico de Ig humana" como se usa en este documento incluye tanto secuencias de origen natural de un segmento génico de Ig humana, formas degeneradas de secuencias de origen natural de un segmento génico de Ig humana, así como secuencias sintéticas que codifican una secuencia polipeptídica sustancialmente idéntica al polipéptido codificado por una secuencia de origen natural de un segmento génico de Ig humana. Por "sustancialmente" se entiende que el grado de identidad de la secuencia de aminoácidos es al menos aproximadamente 85%-95%. Preferiblemente, el grado de identidad de la secuencia de aminoácidos es mayor que 90%, más preferiblemente mayor que 95%.

Por "meganucleasa" se entiende una endodesoxiribonucleasa que reconoce sitios de reconocimiento largos en ADN, preferiblemente al menos 12, más preferiblemente al menos 13, más preferiblemente al menos 14, más preferiblemente

al menos 15, más preferiblemente al menos 16, más preferiblemente al menos 17, y lo más preferiblemente al menos 18 nucleótidos de longitud. Las meganucleasas incluyen nucleasas con dedos de zinc, endonucleasas de referencia de origen natural y nucleasas con dedos de zinc modificadas a medida y endonucleasas de referencia. Lo que se requiere para su uso en la invención es que la meganucleasa reconozca una secuencia diana de meganucleasa presente en o
 5 próxima a un locus de Ig endógeno en el animal en cuestión de manera que se pueda introducir una mutación funcional en el locus de Ig mediante la acción de la meganucleasa. Para más información sobre meganucleasas, véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nos. 20060206949, 20060153826, 20040002092, 20060078552, y 20050064474.

Se pueden generar nucleasas con dedos de zinc con especificidad alterada combinando dedos de zinc individuales con
 10 diferentes dianas triples. La especificidad de las endonucleasas de referencia de origen natural se puede alterar mediante manipulación de proteínas basada en la estructura. Por ejemplo, véase Proteus and Carroll, nature biotechnology 23(8):967-97, 2005.

Un animal que tiene un "locus de Ig inactivado en la línea germinal" o "locus de Ig endógeno inactivado en la línea
 15 germinal" o "mutación de la línea germinal en un locus de Ig endógeno" tiene un locus de Ig endógeno inactivado en cada célula, esto es, cada célula germinal o somática. En la presente invención, los animales que tienen loci inactivados en la línea germinal se producen por mutación, según se efectúa por la acción de una meganucleasa en una célula germinal que da lugar al animal resultante, o un predecesor del mismo.

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

En la presente invención, las meganucleasas se usan para inactivar loci de Ig endógenos para producir células
 20 germinales viables que tienen al menos un locus de Ig endógeno inactivado. Los procedimientos implican expresar al menos una meganucleasa en una célula germinal, un ovocito fertilizado o un embrión, para generar una célula germinal viable que tiene al menos un locus de Ig endógeno inactivado. La meganucleasa así expresada reconoce una secuencia diana de meganucleasa presente en o próxima a un locus de Ig endógeno en el animal en cuestión.

En una realización, en la que la meganucleasa se expresa en una célula germinal, la célula germinal en la que se
 25 expresa la meganucleasa produce una célula germinal viable que tiene al menos un locus de Ig endógeno inactivado. Alternativamente, se puede obtener una célula germinal viable que tiene al menos un locus de Ig endógeno inactivado a partir de un animal derivado de la célula germinal en la que se expresó la meganucleasa.

En una realización, en la que la meganucleasa se expresa en un ovocito fertilizado o embrión, la célula germinal viable
 30 que tiene al menos un locus de Ig endógeno inactivado se puede obtener de un animal derivado del ovocito fertilizado o embrión en el que se expresó la meganucleasa.

Inactivación de loci de Ig endógenos

La inactivación de los loci de Ig endógenos se realiza usando meganucleasas específicas para fragmentos de genes de
 35 inmunoglobulinas en loci de cadenas pesadas y/o ligeras endógenos al animal en cuestión. En una realización, se pueden inducir roturas de doble cadena mediante la inyección de una meganucleasa en células germinales, ovocitos fertilizados o embriones. Alternativamente, los vectores de expresión o el ácido nucleico que codifica una meganucleasa y que se pueden expresar en células germinales, ovocitos fertilizados o embriones se pueden inyectar en el mismo.

En una realización, el procedimiento implica la transfección de células germinales, que pueden incluir precursores de las
 40 mismas, tales como células madre espermatogonias, in vitro o in vivo con un ácido nucleico que codifica una meganucleasa o una construcción de expresión. Por ejemplo, véase Ryu et al., J. Androl., 28:353-360, 2007; Orwig et al., Biol. Report, 67:874-879, 2002.

Una construcción de expresión de meganucleasa está integrada en el genoma del animal en cuestión. La expresión del
 transgén que codifica la meganucleasa en las células germinales dará como resultado roturas de doble cadena en los loci de Ig endógenos y la posterior mutación del sitio de restricción. El apareamiento de tales animales transgénicos da como resultado descendiente con loci de inmunoglobulina mutados/inactivados.

En una realización altamente preferida de la presente invención, una construcción de expresión de meganucleasas
 45 regulable se integra en el genoma del animal en cuestión, cuya construcción regulable es inducible en células germinales. Tales construcciones proporcionan la minimización de los efectos citotóxicos asociados con la expresión de una meganucleasa particular mediante expresión controlada a través de promotores inducibles, por ejemplo, promotores inducibles por calor, promotores inducibles por radiación, operón de tetraciclina, promotores inducibles por hormona y
 50 promotores inducibles por dimerización de transactivadores, y similares. Por ejemplo, véase Vilaboa et al., Current Gene Therapy, 6:421-438, 2006.

Alternativamente, la expresión de meganucleasa se puede inducir en un embrión derivado de la célula germinal.

En una realización, se expresa una sola meganucleasa en una célula germinal, en la que la meganucleasa reconoce
 55 una secuencia diana en o próxima a un locus de inmunoglobulina endógeno a la célula germinal del animal en cuestión. En una realización preferida, la secuencia diana de meganucleasa está en o próxima a un segmento génico J. En otra

- realización preferida, la secuencia diana de meganucleasa está en o próxima a un gen de región constante de inmunoglobulina. En una realización preferida, el gen de la región constante de inmunoglobulina codifica la inmunoglobulina μ .
- 5 En una realización preferida, se usan al menos dos meganucleasas que tienen secuencias diana distintas. Las al menos dos meganucleasas se expresan en una célula germinal, en la que las meganucleasas reconocen secuencias diana distintas en o próximas a un locus de inmunoglobulina endógeno a la célula germinal del animal en cuestión.
- 10 En una realización preferida, las primera y segunda meganucleasas se dirigen a segmentos génicos J. En una realización, la primera y segunda secuencias diana de meganucleasa son, tomadas juntas, aguas arriba y aguas abajo de uno o más segmentos génicos J dentro del locus de Ig endógeno, y la escisión por la primera y segunda meganucleasas codificadas produce la supresión de un segmento de ADN genómico que comprende uno o más segmentos génicos J
- 15 En otra realización, la primera y la segunda meganucleasas se dirigen a segmentos génicos de la región constante. En una realización, la primera y segunda secuencias diana de meganucleasa son, tomadas juntas, aguas arriba y aguas abajo de uno o más segmentos génicos de la región constante de inmunoglobulina, y la escisión por la primera y segunda meganucleasas codificadas produce la supresión de un segmento de ADN genómico que comprende uno o más segmentos génicos de la región constante de inmunoglobulina. En una realización preferida, el gen de la región constante codifica la inmunoglobulina μ .
- 20 En una realización, se suprime un locus de cadena pesada de Ig y/o cadena pesada de Ig endógeno completo, o grandes partes del mismo del genoma del animal en cuestión. Tales animales también se denominan que comprenden un locus endógeno que se ha inactivado.
- 25 En una realización, al menos una meganucleasa se usa para desestabilizar la región CH1 de un locus de cadena pesada de Ig endógeno, dejando el resto del locus intacto y capaz de producir una cadena pesada de Ig que evite la asociación típica de inmunoglobulina: acompañante. Preferiblemente, este direccionamiento de CH1 se realiza en un animal que carece de un locus de cadena ligera de Ig funcional. Tal direccionamiento en tales animales es útil para producir anticuerpos solos de cadena pesada.
- En una realización, se usa más de una meganucleasa para dirigir CH1 dentro del locus de cadena pesada de Ig.
- En una realización, se usan dos meganucleasas que reconocen sitios adyacentes. En una realización, los sitios son elementos de un palíndromo. En una realización, las dos meganucleasas están unidas por un enlazante.
- 30 En las realizaciones preferidas, las estrategias de mejora utilizadas se diseñan para obtener animales que son nullizygous para cadenas ligeras de Ig endógenas y/o cadenas pesadas de Ig endógenas.
- Animales transgénicos que comprenden construcciones de expresión de meganucleasa genómicas regulables
- En un aspecto, la divulgación proporciona animales transgénicos que comprenden al menos una construcción de expresión de meganucleasa genómica regulable.
- 35 Los animales transgénicos se seleccionan de animales de laboratorio pequeños, particularmente aves (pollo, pavo, codorniz, pato, faisán o ganso y similares), roedores (por ejemplo, ratas, hámsteres y cobayas) y comadrejas (por ejemplo, hurones).
- 40 En una realización preferida, la construcción de expresión de meganucleasa genómica regulable comprende una región de control de expresión inducible unida operativamente a un ácido nucleico que codifica una meganucleasa. La región de control de la expresión inducible es funcionalmente inducible en una célula germinal del animal transgénico particular, y la meganucleasa codificada es selectiva para una secuencia diana de meganucleasa situada en o próxima a un locus de inmunoglobulina endógena del animal en cuestión.
- 45 Una construcción de expresión de meganucleasa regulable proporciona la minimización de los efectos citotóxicos asociados con la expresión de una meganucleasa particular mediante expresión controlada a través de promotores inducibles, por ejemplo, promotores inducibles por calor, promotores inducibles por radiación, operón de tetraciclina, promotores inducibles por hormona y promotores inducibles por dimerización de transactivadores, y similares.
- En una realización preferida, un animal transgénico de la invención comprende dos construcciones de expresión de meganucleasas genómicas regulables, que comprende dos ácidos nucleicos distintos que codifican dos meganucleasas distintas que reconocen dos secuencias diana distintas. Las dos meganucleasas en combinación funcionan para suprimir un segmento de ADN genómico de un locus de Ig endógeno y, así, inactivan el mismo.
- 50 Los animales transgénicos que comprenden al menos una construcción de expresión de meganucleasa genómica regulable se pueden preparar por medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un vector transgénico que contiene una región de control de expresión inducible unida operativamente a un ácido nucleico que codifica una meganucleasa

se puede introducir en una célula o células receptoras y luego integrarse en el genoma de la célula o células receptoras mediante integración aleatoria o integración dirigida.

5 Para la integración aleatoria, dicho vector transgénico se puede introducir en una célula receptora mediante tecnología transgénica estándar. Por ejemplo, un vector transgénico se puede inyectar directamente en el pronúcleo de un ovocito fertilizado. También se puede introducir un vector transgénico mediante coincubación de esperma con el vector transgénico antes de la fertilización del ovocito. Los animales transgénicos se pueden desarrollar a partir de ovocitos fertilizados. Otra forma de introducir un vector transgénico es transfectar células madre embrionarias u otras células pluripotentes (por ejemplo, células germinales primordiales) y posteriormente inyectar las células genéticamente modificadas en embriones en desarrollo. Alternativamente, un vector transgénico (desnudo o en combinación con reactivos facilitadores) se puede inyectar directamente en un embrión en desarrollo. En otra realización, el vector transgénico se introduce en el genoma de una célula y un animal se deriva de la célula transfectada mediante clonación por transferencia nuclear.

15 Para la integración dirigida, dicho vector transgénico puede ser introducido en células receptoras apropiadas tales como células madre embrionarias o células somáticas ya diferenciadas. Posteriormente, las células en las que el transgén se ha integrado en el genoma animal en el sitio dirigido mediante recombinación homóloga se pueden seleccionar por procedimientos estándar. Las células seleccionadas se pueden fusionar luego con células de la unidad de transferencia nuclear enucleadas, por ejemplo, ovocitos o células madre embrionarias, células que son totipotentes y capaces de formar un neonato funcional. La fusión se realiza de acuerdo con técnicas convencionales que están bien establecidas. Véase, por ejemplo, Cibelli et al., Science (1998) 280:1256 Zhou et al. Science (2003) 301: 1179. La enucleación de ovocitos y la transferencia nuclear también se pueden realizar mediante microcirugía usando pipetas de inyección. (Véase, por ejemplo, Wakayama et al., Nature (1998) 394: 369). Las células resultantes se cultivan luego en un medio apropiado, y se transfieren a receptores sincronizados para generar animales transgénicos. Alternativamente, las células genéticamente modificadas seleccionadas se pueden inyectar en embriones en desarrollo.

25 En una realización, se usa una meganucleasa para aumentar la frecuencia de recombinación homóloga en un sitio dirigido a través de la escisión de ADN de doble cadena.

Animales transgénicos que comprenden loci de Ig artificiales y capaces de producir anticuerpos con idiotipos humanos

En un aspecto, la invención proporciona animales transgénicos capaces de producir inmunoglobulinas que tienen idiotipos humanos, así como procedimientos de preparación de los mismos.

30 Los animales transgénicos usados se seleccionan particularmente de aves (pollo, pavo, codorniz, pato, faisán o ganso y similares), roedores (por ejemplo, ratas, hámsteres y cobayas) y comadrejas (por ejemplo, hurones).

35 Los animales transgénicos usados para la producción de anticuerpos humanizados en la invención portan mutaciones en la línea germinal en loci de Ig endógenos que se han efectuado por la actividad de una o más meganucleasas. En una realización preferida, los animales transgénicos son nullizygous para la cadena ligera de Ig endógena y/o endógena. Además, estos animales portan al menos un locus de Ig artificial que es funcional y capaz de producir un repertorio de moléculas de inmunoglobulina en el animal transgénico. Los loci de Ig artificiales usados en la invención incluyen al menos un segmento génico V humano.

40 En una realización preferida, los animales transgénicos portan al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial y al menos un locus de cadena ligera de Ig artificial que son cada uno funcionales y capaces de producir un repertorio de moléculas de inmunoglobulina en el animal transgénico, cuyo repertorio de las moléculas de inmunoglobulina incluyen anticuerpos que tienen un idiotipo humano. En una realización, se usan loci artificiales que incluyen al menos un gen C no humano, y se proporcionan animales capaces de producir anticuerpos quiméricos que tienen un idiotipo humano y una región constante no humana. En una realización, se usan loci artificiales que incluyen al menos un gen C humano, y se proporcionan animales capaces de producir anticuerpos que tienen un idiotipo humano y una región constante humana.

45 En otra realización preferida, los animales transgénicos llevan al menos un locus de cadena pesada de Ig artificial, y carecen de un locus de cadena ligera de Ig funcional. Tales animales encuentran uso en la producción de anticuerpos de cadena pesada.

50 La producción de tales animales transgénicos implica la integración de uno o más loci de Ig de cadena pesada artificial y uno o más loci de Ig de cadena ligera artificial en el genoma de un animal transgénico que tiene al menos un locus de Ig endógeno que ha sido o será inactivado por la acción de una o más meganucleasas. Preferiblemente, los animales transgénicos son nullizygous para cadena pesada de Ig endógena y/o cadena ligera de Ig endógena y, de acuerdo con lo anterior, incapaces de producir inmunoglobulinas endógenas. Independientemente de la ubicación cromosómica, un locus de Ig artificial de la presente divulgación tiene la capacidad de experimentar un reordenamiento génico y producir así un repertorio diversificado de moléculas de inmunoglobulina. Un locus de Ig que tiene la capacidad de experimentar un reordenamiento génico también se denomina en este documento locus de Ig "funcional", y los anticuerpos con una diversidad generada por un locus de Ig funcional también se denominan en este documento anticuerpos "funcionales" o un repertorio "funcional" de anticuerpos.

- 5 Los loci artificiales usados para generar tales animales transgénicos incluyen cada uno segmentos génicos de inmunoglobulinas múltiples, que incluyen al menos un segmento génico de la región V, uno o más segmentos génicos J, uno o más segmentos génicos D en el caso de un locus de cadena pesada y uno o más genes de región constante. En la presente invención, al menos uno de los segmentos génicos V codifica una secuencia de aminoácidos de la región V humana hipermutada o de la línea germinal. De acuerdo con lo anterior, tales animales transgénicos tienen la capacidad de producir un repertorio diversificado de moléculas de inmunoglobulina, que incluyen anticuerpos que tienen un idiotipo humano.
- 10 En una realización, los loci artificiales usados comprenden al menos un segmento génico de región C no humana. De acuerdo con lo anterior, tales animales transgénicos tienen la capacidad de producir un repertorio diversificado de moléculas de inmunoglobulina, que incluyen anticuerpos quiméricos que tienen un idiotipo humano.
- En una realización, los loci artificiales usados comprenden al menos un segmento génico de la región C humana. De acuerdo con lo anterior, tales animales transgénicos tienen la capacidad de producir un repertorio diversificado de moléculas de inmunoglobulina, que incluyen anticuerpos que tienen un idiotipo humano y una región constante humana.
- 15 En una realización, los loci artificiales usados comprenden al menos un gen de región constante artificial. Por ejemplo, un gen de región constante C artificial de ejemplo es un gen de región constante que codifica un dominio CH1 de IgG humana y un dominio CH2 y CH3 de IgG de rata. De acuerdo con lo anterior, tales animales transgénicos tienen la capacidad de producir un repertorio diversificado de moléculas de inmunoglobulina, que incluyen anticuerpos que tienen un idiotipo humano y una región artificial constante que comprende componentes tanto humanos como no humanos.
- 20 El vector transgénico que contiene un locus de Ig artificial se introduce en la célula o células receptoras y luego se integra en el genoma de la célula o células receptoras mediante integración dirigida.
- Como referencia, para la integración aleatoria, un vector transgénico que contiene un locus de Ig artificial se puede introducir en una célula receptora mediante tecnología transgénica estándar. Por ejemplo, un vector transgénico se puede inyectar directamente en el pronúcleo de un ovocito fertilizado. También se puede introducir un vector transgénico mediante coincubación de esperma con el vector transgénico antes de la fertilización del ovocito. Los animales transgénicos se pueden desarrollar a partir de ovocitos fertilizados. Otra forma de introducir un vector transgénico es transfectar células madre embrionarias u otras células pluripotentes (por ejemplo, células germinales primordiales) y posteriormente inyectar las células genéticamente modificadas en embriones en desarrollo.
- 25 Alternativamente, un vector transgénico (desnudo o en combinación con reactivos facilitadores) se puede inyectar directamente en un embrión en desarrollo. Finalmente, los animales transgénicos quiméricos se producen a partir de los embriones que contienen el transgén de Ig artificial integrado en el genoma de al menos algunas células somáticas del animal transgénico. En otra realización, el vector transgénico se introduce en el genoma de una célula y un animal se deriva de la célula transfectada mediante clonación por transferencia nuclear.
- 30 Se describe un procedimiento en el que un transgén que contiene un locus de Ig artificial se integra aleatoriamente en el genoma de células receptoras (tales como ovocitos fertilizados o embriones en desarrollo). Las células receptoras se derivan de un animal que tiene al menos un
- 35 locus de Ig endógeno que ha sido inactivado por la acción de una o más meganucleasas. Alternativamente, los animales transgénicos que portan loci de inmunoglobulina artificial, se puede cruzar con animales transgénicos que tienen al menos un locus de Ig endógeno que ha sido inactivado por la acción de una o más meganucleasas. Independientemente del procedimiento particular usado, en una realización preferida, se obtienen descendientes que son nullizygous para cadena pesada de Ig endógena y/o cadena ligera de Ig y, de acuerdo con lo anterior, incapaces de producir inmunoglobulinas endógenas y capaces de producir inmunoglobulinas transgénicas.
- 40 Para la integración dirigida, se puede introducir un vector transgénico en células receptoras apropiadas tales como células madre embrionarias, otras células pluripotentes o células somáticas ya diferenciadas. Después, las células en las que el transgén se ha integrado en el genoma del animal y ha reemplazado el locus de Ig endógeno correspondiente por recombinación homóloga se pueden seleccionar por procedimientos estándar. Las células seleccionadas se pueden fusionar luego con células de la unidad de transferencia nuclear enucleadas, por ejemplo, ovocitos o células madre embrionarias, células que son totipotentes y capaces de formar un neonato funcional. La fusión se realiza de acuerdo con técnicas convencionales que están bien establecidas. Véase, por ejemplo, Cibelli et al., Science (1998) 280:1256; Zhou et al. Science (2003) 301: 1179. La enucleación de ovocitos y la transferencia nuclear también se puede realizar mediante microcirugía usando pipetas de inyección. (Véase, por ejemplo, Wakayama et al., Nature (1998) 394:369.). Las células resultantes se cultivan luego en un medio apropiado, y se transfieren a receptores sincronizados para generar animales transgénicos. Alternativamente, las células genéticamente modificadas seleccionadas se pueden inyectar en embriones en desarrollo que posteriormente se desarrollan en animales quiméricos.
- 45
- 50
- 55 En una realización, se usa una meganucleasa para aumentar la frecuencia de recombinación homóloga en un sitio dirigido a través de la escisión de ADN de doble cadena. Para la integración en loci de inmunoglobulina endógena, se puede usar una meganucleasa específica de sitio. En una realización, una meganucleasa dirigida a un locus de Ig

endógeno se usa para aumentar la frecuencia de recombinación homóloga y el reemplazo de un locus de Ig endógeno, o partes del mismo con un locus de Ig artificial, o partes del mismo.

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

5 Loci de Ig artificiales

La presente divulgación se dirige además a loci de Ig artificiales y a su uso en la fabricación de animales transgénicos capaces de producir inmunoglobulinas que tienen un idiotipo humano.

10 Cada locus de Ig artificial comprende segmentos génicos de inmunoglobulina múltiples, que incluyen al menos un segmento génico de la región V, uno o más segmentos génicos J, uno o más segmentos génicos D en el caso de un locus de la cadena pesada y uno o más genes de la región constantes. En la presente invención, al menos uno de los segmentos génicos V codifica una secuencia de aminoácidos de la región V humana hipermutada o de la línea germinal. De acuerdo con lo anterior, tales animales transgénicos tienen la capacidad de producir un repertorio diversificado de moléculas de inmunoglobulina, que incluyen anticuerpos que tienen un idiotipo humano. En loci de cadena pesada se pueden incluir segmentos génicos D derivados, humanos o no humanos en los loci de Ig artificiales. Los segmentos 15 génicos en tales loci se yuxtaponen entre sí en una configuración sin reorganizar (o "la configuración de línea germinal"), o en una configuración parcial o totalmente reorganizada. Los loci de Ig artificiales tienen la capacidad de experimentar reordenamiento génico (si los segmentos génicos no están completamente reordenados) en el animal en cuestión, produciendo así un repertorio diversificado de inmunoglobulinas que tienen idiotipos humanos.

20 Los elementos reguladores como promotores, potenciadores, regiones de conmutación, señales de recombinación y similares pueden ser de origen humano o no humano. Lo que se requiere es que los elementos sean operables en la especie animal en cuestión, para hacer funcionales los loci artificiales.

25 Se describen construcciones transgénicas que contienen un locus de cadena pesada artificial capaz de experimentar un reordenamiento génico en el animal huésped, produciendo así un repertorio diversificado de cadenas pesadas que tienen idiotipos humanos. Un locus de cadena pesada artificial del transgén contiene una región V con al menos un segmento génico V humano. Preferiblemente, la región V incluye al menos aproximadamente 5-100 segmentos génicos V (o "VH") de cadena pesada humana. Como se describió anteriormente, un segmento VH humano abarca secuencias de origen natural de un segmento génico VH humano, formas degeneradas de secuencias de origen natural de un segmento génico VH humano, así como secuencias sintéticas que codifican una secuencia polipeptídica sustancialmente (esto es, al menos aproximadamente 85% -95%) idéntica a un polipéptido de dominio V de cadena 30 pesada humana.

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

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

40 En otra realización preferida, el locus de cadena pesada artificial contiene genes de región constante artificial que carecen de dominios CH1. En una realización preferida, dichos genes de región constante artificial codifican IgM truncada y/o IgG que carece del dominio CH1 pero que comprende los dominios CH2 y CH3 o CH1, CH2, CH3 y CH4. Las cadenas pesadas que carecen de los dominios CH1 no pueden emparejarse eficazmente con las cadenas ligeras de Ig y formar solo anticuerpos de cadena pesada.

45 También se describen construcciones transgénicas que contienen un locus de cadena ligera artificial capaz de experimentar un reordenamiento génico en el animal huésped, produciendo así un repertorio diversificado de cadenas ligeras que tienen idiotipos humanos. Un locus de cadena ligera artificial del transgén contiene una región V con al menos un segmento génico V humano, por ejemplo, una región V que tiene al menos un gen VL humano y/o al menos un segmento VJ humano reorganizado. Preferiblemente, la región V incluye al menos aproximadamente 5-100 segmentos génicos de la cadena ligera humana V (o "VL"). Consistentemente, un segmento VL humano abarca secuencias de origen natural de un segmento génico VL humano, formas degeneradas de secuencias de origen natural de un segmento génico VL humano, así como secuencias sintéticas que codifican sustancialmente una secuencia polipeptídica (esto es, al menos aproximadamente 85% - 95%) idéntica a un polipéptido de dominio V de cadena ligera 50 humana. En una realización, el locus de Ig de cadena ligera artificial tiene una región C que tiene al menos un gen C de rata (por ejemplo, C λ o C κ de rata).

55 También se describen procedimientos de preparación de un vector transgénico que contiene un locus de Ig artificial. Tales procedimientos implican aislar loci de Ig o fragmentos del mismo, y combinarlos con uno o varios fragmentos de ADN que comprenden secuencias que codifican elementos de la región V humana. El (los) segmento(s) del gen de Ig se

insertan en el locus de Ig artificial o una porción del mismo por unión o recombinación homóloga de manera que se retenga la capacidad del locus para experimentar un reordenamiento génico efectivo en el animal en cuestión.

Preferiblemente, se aísla un locus de Ig no humana mediante el cribado de una biblioteca de plásmidos, cósmidos, YAC o BAC, y similares, preparados a partir del ADN genómico de los mismos. Los clones YAC pueden transportar fragmentos de ADN de hasta 2 megabases, de este modo se puede aislar un locus completo de la cadena pesada animal o una gran parte del mismo en un clon YAC, o reconstruir para que esté contenido en un clon YAC. Los clones BAC son capaces de transportar fragmentos de ADN de tamaños más pequeños (aproximadamente 50-500 kb). Sin embargo, múltiples clones de BAC que contienen fragmentos solapantes de un locus de Ig se pueden alterar por separado y posteriormente inyectarse juntos en una célula receptora de animal, en la que los fragmentos solapantes se recombinan en la célula animal receptora para generar un locus de Ig continuo.

Los segmentos génicos de Ig humana se pueden integrar en el locus de Ig en un vector (por ejemplo, un clon BAC) mediante una diversidad de procedimientos, que incluyen la unión de fragmentos de ADN o la inserción de fragmentos de ADN mediante recombinación homóloga. La integración de los segmentos génicos Ig humana se realiza de manera que el segmento génico de Ig humana esté operativamente unido a la secuencia del huésped en el transgén para producir un locus de Ig humanizado funcional, esto es, un locus de Ig capaz de reordenamiento génico que conduzca a la producción de un repertorio diversificado de anticuerpos con idiotipos humanos. La recombinación homóloga se puede realizar en bacterias, levaduras y otras células con una alta frecuencia de eventos de recombinación homóloga. Los YAC y BAC diseñados se pueden aislar fácilmente de las células y usarse para producir animales transgénicos.

Inmunoglobulinas que tienen un idiotipo humano

Una vez que se prepara un animal transgénico capaz de producir inmunoglobulinas que tienen un idiotipo humano, las inmunoglobulinas y las preparaciones de anticuerpos contra un antígeno se pueden obtener fácilmente inmunizando el animal con el antígeno. "Composición de antisuero policlonal" como se usa en este documento incluye preparaciones de anticuerpos policlonales purificados por afinidad.

Se puede usar una variedad de antígenos para inmunizar un animal transgénico. Tales antígenos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, por ejemplo, virus y organismos unicelulares (como bacterias y hongos), vivos, atenuados o muertos, fragmentos de los microorganismos o moléculas antigénicas aisladas de los microorganismos.

Los antígenos bacterianos preferidos para uso en la inmunización de un animal incluyen antígenos purificados de *Staphylococcus aureus* tales como polisacáridos capsulares tipo 5 y 8, versiones recombinantes de factores de virulencia tales como alfa toxina, proteínas de unión a adhesina, proteínas de unión a colágeno y proteínas de unión a fibronectina. Los antígenos bacterianos preferidos también incluyen una versión atenuada de *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *enterococcus*, *enterobacter*, y *Klebsiella pneumoniae*, o sobrenadante de cultivo de estas células de bacterias. Otros antígenos bacterianos que se pueden usar en la inmunización incluyen lipopolisacáridos purificados (LPS), antígenos capsulares, polisacáridos capsulares y/o versiones recombinantes de las proteínas de membrana externa, proteínas de unión a fibronectina, endotoxina y exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*, *enterococcus*, *enterobacter* y *Klebsiella pneumoniae*.

Los antígenos preferidos para la generación de anticuerpos contra hongos incluyen una versión atenuada de hongos o proteínas de membrana externa de los mismos, hongos que incluyen, pero no se limitan a, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Cryptococcus neoformans*.

Los antígenos preferidos para uso en inmunización con el fin de generar anticuerpos contra virus incluyen las proteínas envolventes y versiones atenuadas de virus que incluyen, pero no se limitan a virus sincicial respiratorio (RSV) (particularmente la proteína F), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la hepatitis B (HBV), citomegalovirus (CMV), EBV, y HSV.

Se pueden generar anticuerpos específicos para cáncer inmunizando animales transgénicos con células tumorales aisladas o líneas celulares tumorales así como antígenos asociados a tumores que incluyen, pero no se limitan a, antígeno Her-2-neu (anticuerpos contra los cuales son útiles para el tratamiento del cáncer de mama); antígenos CD20, CD22 y CD53 (anticuerpos contra los cuales son útiles para el tratamiento de linfomas de células B), antígeno prostático específico de membrana (PMSA) (anticuerpos contra los cuales son útiles para el tratamiento del cáncer de próstata) y molécula 17-1A (anticuerpos contra que son útiles para el tratamiento del cáncer de colon).

Los antígenos se pueden administrar a un animal transgénico de cualquier manera conveniente, con o sin un adyuvante, y se pueden administrar de acuerdo con un programa predeterminado.

Para hacer un anticuerpo monoclonal, las células del bazo se aíslan del animal transgénico inmunizado y se utilizan ya sea en la fusión celular con líneas celulares transformadas para la producción de hibridomas, o anticuerpos que codifican ADNc se clonan mediante técnicas de biología molecular estándar y se expresan en células transfectadas. Los procedimientos de producción de anticuerpos monoclonales están bien establecidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Solicitud de Patente Europea 0 583 980 A1 ("Method For Generating Monoclonal Antibodies From Rabbits"), la Patente de los Estados Unidos No. 4,977,081 ("Stable Rabbit-Mouse Hybridomas And Secretion Products Thereof), el

- documento WO 97/16537 ("Stable Chicken B-cell Line And Method of Use Thereof), y EP 0491 057 B1 ("Hybridoma Which Produces Avian Specific Immunoglobulin G"). La producción in vitro de anticuerpos monoclonales a partir de moléculas de ADNc clonadas se ha descrito por Andris-Widhopf et al., "Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by phage display", J Immunol Methods 242:159 (2000), y por Burton, D. R., "Phage display", Immunotechnology 1:87 (1995).
- 5 Una vez que se han generado anticuerpos monoclonales quiméricos con idiotipos humanos, tales anticuerpos quiméricos se pueden convertir fácilmente en anticuerpos completamente humanos usando técnicas de biología molecular estándar. Los anticuerpos monoclonales completamente humanos no son inmunogénicos en humanos y son apropiados para su uso en el tratamiento terapéutico de sujetos humanos.
- 10 Los anticuerpos de la divulgación incluyen anticuerpos solamente de cadena pesada
- En una realización, los animales transgénicos que carecen de un locus de cadena ligera de Ig funcional, y que comprenden un locus de cadena pesada artificial, se inmunizan con antígeno para producir anticuerpos solamente de cadena pesada que se unen específicamente al antígeno.
- 15 También se describen células productoras de anticuerpos monoclonales derivadas de tales animales, así como ácidos nucleicos derivados de los mismos. También se describen hibridomas derivados de los mismos. También se proporcionan anticuerpos solamente de cadena pesada totalmente humana, así como ácidos nucleicos codificantes, derivados de los mismos.
- 20 Las enseñanzas sobre anticuerpos solamente de cadena pesada se encuentran en la técnica. Por ejemplo, véanse las publicaciones PCT WO02085944, WO02085945, WO2006008548 y WO2007096779. Véanse también los documentos US 5,840,526; US 5,874,541; US 6,005,079; US 6,765,087; US 5,800,988; EP 1589107; WO 9734103; y US 6,015,695.
- Composiciones farmacéuticas
- En una realización adicional de la presente divulgación, los anticuerpos monoclonales o policlonales purificados se mezclan con un portador farmacéutico apropiado para administración a pacientes, para proporcionar composiciones farmacéuticas.
- 25 Los pacientes tratados con las composiciones farmacéuticas de la invención son preferiblemente mamíferos, más preferiblemente humanos, aunque también se contemplan usos veterinarios.
- Los portadores farmacéuticamente aceptables que se pueden emplear en las presentes composiciones farmacéuticas pueden ser cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, agentes isotónicos y similares. Excepto en la medida en que cualquier medio, agente, diluyente o portador convencional sea perjudicial para el receptor o para la eficacia terapéutica de los anticuerpos contenidos en el mismo, su uso en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación es apropiado.
- 30 El portador puede ser líquido, semisólido, por ejemplo, pastas, o portadores sólidos. Los ejemplos de portadores incluyen aceites, agua, soluciones salinas, alcohol, azúcar, gel, lípidos, liposomas, resinas, matrices porosas, aglutinantes, cargas, revestimientos, conservantes y similares, o combinaciones de los mismos.
- 35 Procedimientos de tratamiento
- También se describen procedimientos de tratamiento de una enfermedad en un vertebrado, preferiblemente un mamífero, preferiblemente un primate, siendo los sujetos humanos una opción especialmente preferida, administrando una composición de anticuerpo purificada de la divulgación deseable para tratar dicha enfermedad.
- 40 Las composiciones de anticuerpos se pueden usar para unir y neutralizar o modular una entidad antigénica en los tejidos corporales humanos que causa o contribuye a la enfermedad o que provoca respuestas inmunes no deseadas o anormales. Una "entidad antigénica" se define en este documento para abarcar cualquier molécula soluble o unida a la superficie celular que incluya proteínas, así como células u organismos o agentes causantes de enfermedades infecciosas que sean al menos capaces de unirse a un anticuerpo y preferiblemente también sean capaces de estimular una respuesta inmune.
- 45 La administración de una composición de anticuerpo contra un agente infeccioso como monoterapia o en combinación con quimioterapia da como resultado la eliminación de partículas infecciosas. Una sola administración de anticuerpos disminuye el número de partículas infecciosas generalmente de 10 a 100 veces, más comúnmente de más de 1000 veces. De forma similar, la terapia con anticuerpos en pacientes con una enfermedad maligna empleada como monoterapia o en combinación con quimioterapia reduce el número de células malignas generalmente de 10 a 100 veces, o más de 1000 veces. La terapia se puede repetir durante un período de tiempo prolongado para asegurar la eliminación completa de partículas infecciosas, células malignas, etc. En algunos casos, la terapia con preparaciones de anticuerpos continuará durante largos períodos de tiempo en ausencia de cantidades detectables de partículas infecciosas o células indeseables.
- 50

De manera similar, el uso de la terapia de anticuerpos para la modulación de respuestas inmunitarias puede consistir en administraciones únicas o múltiples de anticuerpos terapéuticos. La terapia se puede continuar durante períodos prolongados de tiempo en ausencia de cualquier síntoma de la enfermedad.

- 5 El tratamiento en cuestión se puede emplear junto con quimioterapia a dosis suficientes para inhibir enfermedades infecciosas o tumores malignos. En pacientes con enfermedad autoinmune o receptores de trasplantes, la terapia con anticuerpos se puede emplear junto con la terapia inmunosupresora a dosis suficientes para inhibir las reacciones inmunes.

Experimental

Evolución dirigida de endonucleasas de referencia específicas para secuencias de inmunoglobulina de rata.

- 10 Un análisis de las secuencias de exones de IgM de rata dio como resultado la identificación de varias secuencias de escisión diana para la manipulación endonucleasas de referencia. Usando la endonucleasa de referencia I-SceI, se identificaron dos secuencias diana, una dentro del exón II de IgM de rata (CGTGGATCACAGGGGTCT) y la otra dentro del exón III de IgM de rata (CTGGGATAACAGGAAGGA). Estos sitios comparten el 61% (11 de 18 bases) de identidad de secuencia con la secuencia de reconocimiento natural de I-SceI (TAGGGATAACAGGGTAAT).

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

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

15

Para la manipulación de endonucleasas de referencia específicas para estas secuencias diana, se usa una selección altamente sensible para la evolución dirigida de endonucleasas de referencia que acopla escisión enzimática de ADN con la supervivencia de células huésped (descrita detalladamente por Chen and Zhao, Nucleic Acid Research 33(18):e154, 2005). Se utilizó una estrategia de coevolución in vitro para diseñar variantes de I-SceI con especificidad de secuencia diana. Como se muestra en la tabla 2, para la secuencia diana T3, se seleccionaron dos secuencias nuevas, T3i1 y T3i2 como secuencias intermedias, mientras que para la secuencia diana T4, se seleccionaron dos secuencias nuevas, T4i1 y T4i2, como secuencias intermedias. Las secuencias T3i1 y T4i1 se clonaron en el plásmido indicador para producir p11-LacY-T3i1 y p11-LacY-T4i1, respectivamente.

20

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

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

25

Para obtener mutantes de I-SceI con especificidad de secuencia de T3i1 o T4i1, primero se llevó a cabo el modelado molecular para identificar los residuos que se usaron para crear una biblioteca enfocada mediante mutagénesis de saturación. Como se muestra en la figura 2, I-SceI se une al extremo 3' de T3i1 o T4i1 a través de un bucle relajado que se encuentra en el surco menor del ADN. Los residuos Gly13, Pro14, Asn15 y Lys20 están cerca de este extremo 3' y Asn15 se une directamente a la última timina en el extremo 3' de la secuencia de reconocimiento de tipo salvaje a través de enlaces de hidrógeno. Se construyó una biblioteca de mutantes que contienen todas las combinaciones posibles de sustituciones de aminoácidos en estos cuatro residuos seleccionados mediante mutagénesis de saturación. Para

30

generar una biblioteca lo suficientemente grande, la reacción de unión y los procedimientos de transformación del ADN se optimizaron a través de varios ensayos. Se creó una biblioteca que consta de $2.9 \cdot 10^6$ mutantes.

5 La biblioteca se cribó para mutantes de I-SceI con actividad aumentada hacia la secuencia de T3i1. En comparación con la ronda 0 (I-SceI tipo salvaje), la primera ronda de cribado produjo mutantes con actividad aumentada hacia la secuencia T3i1 ya que la tasa de supervivencia celular se aumentó en 10 veces. El enriquecimiento de los mutantes potencialmente positivos en la ronda 2 y 3 mostró una mejora adicional en la tasa de supervivencia celular. De forma similar, la biblioteca se cribó para mutantes de I-SceI con actividad aumentada hacia la secuencia de T4i1. El cribado de mutantes produjo mutantes con actividad aumentada hacia la secuencia T4i1.

10 En paralelo, se diseñó una segunda biblioteca de mutantes I-SceI dirigidos al extremo 5' de la secuencia de reconocimiento. La primera biblioteca creada usando mutagénesis de saturación se centró en aquellos residuos que interactúan con el extremo 3' de los cuatro nucleótidos de la secuencia de reconocimiento I-SceI. En base al modelado molecular, Trp149, Asp150, Tyr151 y Asn152 se encuentran en el surco mayor formado por los nucleótidos del extremo 5'. Asn152 interactúa directamente con T(-7) a través de enlaces de hidrógeno. Asp150 y Tyr152 interactúan T opuestamente a A(-6) indirectamente a través de una molécula de agua. Trp149 y Tyr151 interactúan con la cadena principal de fosfato. De este modo, estos cuatro residuos son importantes para la especificidad de secuencia de I-SceI y se realizó mutagénesis de saturación simultánea en estos cuatro residuos para crear una segunda biblioteca de mutantes de I-SceI.

La coevolución adicional de estas enzimas da como resultado la generación de nuevas meganucleasas específicas para secuencias diana en exones II y III de IgM de rata (CGTGGATCACAGGGTCT y CTGGGATAACAGGAAGGA)

20 Manipulación de I-Cre con especificidad de secuencia definida

Para la manipulación de endonucleasas de referencia específicas para nuevas secuencias diana, se usó una selección altamente sensible para la evolución dirigida de endonucleasas de referencia que acopla la escisión del ADN enzimático con la supervivencia de las células huésped (descrita detalladamente por Chen and Zhao, Nucleic Acid Research 33(18):e154, 2005). Además, se diseñó una estrategia general para diseñar el mutante I-CreI con especificidad de secuencia definida. I-CreI reconoce una secuencia diana de una manera pseudo palindrómica. Las bases palindrómicas son reconocidas directamente por I-CreI y pueden ser difíciles de alterar (J. Mol. Biol., 280, 345-353) (Fig. 4).

30 Esta propiedad dificulta la manipulación directa de los derivados I-CreI que reconocen una secuencia no palindrómica. Para superar este problema, la secuencia diana se dividió en mitad izquierda (mitad superior) y mitad derecha (mitad descendente). I-CreI está optimizado para las secuencias intermedias del palíndromo de la mitad izquierda y el palíndromo de la mitad derecha, respectivamente (Figura 4). Entonces, los mutantes I-CreI, optimizados para secuencias intermedias, se diseñan para reconocer la secuencia diana palíndromo. Finalmente, el mutante I-CreI optimizado respectivamente para la mitad izquierda y el de la mitad derecha se coexpresarán para la escisión de la secuencia diana. Además, se examina la fusión del mutante optimizado de la mitad izquierda con el mutante optimizado de la mitad derecha mediante un enlazante polipeptídico.

35 Se identificó una secuencia diana dentro del exón IV (CAACTGATCCTGAGGGAGTCGG) que comparte el 59% de identidad de secuencia con la secuencia de reconocimiento natural de la endonucleasa de referencia I-CreI. Posteriormente, basándose en la identidad de las bases palindrómicas dentro de la secuencia diana ICreI original, se seleccionaron dos secuencias, T5 y T6, como secuencias diana para manipulación I-CreI.

Secuencia de reconocimiento I-CreI y 2 secuencias diana:

	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Homología	
	Primera mitad											Segunda mitad											Total	Palíndromo
Original	C	A	A	A	A	C	G	T	C	G	T	G	A	G	A	C	A	G	T	T	T	G		
T5	A	A	A	A	A	T	G	T	C	C	T	T	G	A	A	G	G	T	T	C	A	G	50.0%	64.3%
T6	C	A	A	C	T	G	A	T	C	C	T	G	A	G	G	C	A	G	T	C	G	G	59.1%	57.1%

40

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

Las dos secuencias diana, T5 y T6, se clonaron en plásmidos indicadores. El gen I-CreI se clonó en el plásmido pTrc y se secuenció para confirmar que no se introdujeron mutaciones durante la amplificación por PCR. El sistema de selección I-CreI se evalúa para las tasas de supervivencia celular.

ES 2 664 218 T3

Además, se realizó un modelado molecular y se identificaron residuos de proteína que contactan directamente con el sustrato de ADN. Además, diseñamos las secuencias intermedias para experimentos de coevolución in vitro.

Residuos diana para la mutagénesis de saturación

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

- 5 Posteriormente, las bibliotecas de mutantes ICrel se generan y criban para derivados de ICrel con nuevas secuencias diana. La coevolución adicional de estas enzimas da como resultado la generación de nuevas meganucleasas específicas para una secuencia diana dentro del exón IV de IgM de rata (CAACTGATCCTGAGGGAGTCGG).

Manipulación de nucleasas con dedos de zinc

- 10 Las proteínas con dedos de zinc (ZFP) se diseñaron contra secuencias que codifican IgM de rata (exones 1-4) y se ensamblaron como se describe (Zhang, L. et al. Synthetic zing finger transcription factor action at an endogenous chromosomal site. Activation of the human erythropoietin gene. J. Biol. Chem 275:33850-33860, 2000, y Liu, P. Q. et al. Regulation of an endogenous locus against a panel of designed zinc finger proteins targeted to accessible chromatin regions. Activation of vascular endothelial growth factor. J Biol. Chem. 276:11323-11334, 2001), para producir las siguientes unidades estructurales de ZFP

SBS	Secuencia de reconocimiento	Dedo 1	Dedo 2	Dedo 3	Dedo 4	Dedo 5	Dedo 6	Enlazante 2-3	Enlazante 4-5
170 63	AGACAGGGGGCTC TC	NKVGLI E	TSSDL SR	RSDHL SR	RSDNL SE	QNAHR KT		TGGERP	TGEKP
170 65	AATTTGGTGGCCAT G	RSDAL ST	DRSTR TK	RSDAL AR	RSDSL SA	TSSNR KT		TGGQRP	TGEKP
170 67	GTTCTGGTAGTT	RSANU R	RSDNL RE	TSGSL SR	QSGSL TR	RSDVL SE		TGGGGS QRP	TGSQ KP
170 68	GAAGTCATGCAGG GTGTC	DRSAL SR	TSGHL SR	RSDNL ST	HNATR IN	DRSAL SR	TSGSL TR	TGGQRP	TGSQ KP
170 89	GGTGCCATTGGGG TG	RSDAL AR	RSDHL ST	HSNAR KN	ERGTU R	TSGHL SR	QSGN UR	TGEKP	TGSQ KP
170 90	GCTGTGGGTGTGG CT	QSSDL SR	RSDAL TQ	TSGHL SR	RSDAL SR	DRSDL SR		TGGQRP	TGEKP
171 19	ACCATGTGTGGCA GGG	RSAHL SR	QSGDL TR	RSDAL AR	RSDTL SV	DNSTRI K		TGEKP	TGEKP
171 20	GAGGACCGTGGAC AAG	RSANL SV	DRANL SR	RSDAL AR	DRSDL SR	RSDDL TR		TGEKP	TGEKP

- 15 El ADN que codifica las ZFP se clonó en un vector de expresión. Las células C6 de rata se obtuvieron de American Type Culture Collection y se cultivaron según lo recomendado en medio F-12 (Invitrogen) suplementado con suero de ternera fetal calificado al 5% (FCS, Hyclone), suero de caballo al 15% (Invitrogen) y glutamina 5 mM. Las células se desasociaron del material de plástico usando la proteasa TrypLE Select (Invitrogen). Para la transfección, se mezclaron 200,000 células C6 con 400 ng de ADN plasmídico y 20 µL de Solución SF Amaxa. Las células se transfectaron en un Amaxa Nucleofector II Shuttle usando el programa 96 FF-137 y se recuperaron en 0.1 L de medio F-12 caliente y suplementado. Tres y nueve días después de la transfección se recogieron las células y se preparó ADN cromosómico usando un Quick Extract Solution 1.0 (Epicentre). La región apropiada del locus de IgM se amplificó por PCR usando Accuprime High-fidelity DNA polymerase (Invitrogen). Las reacciones de PCR se calentaron a 94 °C, luego se enfriaron
- 20

gradualmente a temperatura ambiente. Aproximadamente 200 ng del ADN recocido se mezclaron con 0.33 μ L de enzima CEL-I (Transgenomic) y se incubaron durante 20 minutos a 42 °. Los productos de reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en solución reguladora Tris-borato-EDTA 1X. Un ejemplo típico que demuestra la actividad de escisión se muestra en la figura 6.

- 5 Generación de ratas con locus de cadena pesada endógena inactivado utilizando plásmidos de expresión que codifican una meganucleasa

10 Se clona una secuencia de ADNc que codifica una meganucleasa específica para un exón de C μ de rata en un vector de expresión en el que la expresión se controla mediante la secuencia de operador de tetraciclina. El ADN plasmídico se linealiza por digestión con enzimas de restricción y se purifica. Los ovocitos de rata se fecundan con ratas en forma de espermatozoides con un transgén que codifica un transactivador inverso sensible a tetraciclina. El ADN de plásmido purificado se inyecta en pronúcleos de dichos ovocitos de rata fertilizados. Posteriormente, los embriones de rata se transfieren a madres adoptivas y se llevan a término. Los recién nacidos se analizan para detectar la presencia del transgén que codifica la meganucleasa mediante PCR, utilizando ADN aislado de muestras de tejido. Los animales fundadores transgénicos machos se alojan durante cuatro meses cuando alcanzan la madurez sexual. La expresión de meganucleasa en animales transgénicos se induce por administración diaria de doxiciclina de uno a siete días. Posteriormente, los espermatozoides se recogen dos veces por semana y se analizan por PCR. Los animales machos que producen espermatozoides mutados se utilizan para la reproducción. La descendencia con C[μ] mutada de rata se identifica mediante análisis de PCR de muestras de tejido.

- 20 Generación de ratas con locus de cadena pesada endógena inactivado mediante microinyección de ovocitos fertilizados con ADN plasmídico que codifica una meganucleasa específica

25 Se clona una secuencia de ADNc que codifica una meganucleasa específica para un exón C μ de rata en un vector de expresión en el que la expresión se controla mediante el promotor CAG. El ADN de plásmido purificado se inyecta en pronúcleos de ovocitos de rata fertilizados. Posteriormente, los embriones de rata se transfieren a madres adoptivas y se llevan a término. Los recién nacidos se analizan para detectar la presencia de exones mutados de IgM mediante PCR y secuenciación directa. Alternativamente, los animales que contienen células con exones de IgM mutados se identifican mediante la incubación de productos de PCR calentados y enfriados con la enzima CEL-I y la posterior electroforesis en gel.

Listado de secuencias

- <110> OMT, INC.
- 30 <120> Composiciones y procedimientos de inhibición de genes de inmunoglobulinas endógenas y de producción de anticuerpos de idiotipo humanos transgénicos
- <130> P128623EP3
- <140> 11161775.9
- <141> 2008-05-30
- 35 <150> US 60/941,619
- <151> 2007-06-01
- <150> US 61/044,324
- <151> 2008-04-11
- <160> 58
- 40 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 18
- <212> ADN
- <213> Rattus rattus
- 45 <400> 1
- cgtggatcac aggggtct 18
- <210> 2

- <211> 18
 <212> ADN
 <213> Rattus rattus
 <400> 2
- 5 ctgggataac aggaagga 18
 <210> 3
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Rattus rattus
- 10 <400> 3
 tagggataac agggaat 18
 <210> 4
 <211> 18
 <212> ADN
- 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 4
 tagggataac aggggtct 18
- 20 <210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
- 25 <223> Sintética
 <400> 5
 cgtggataac aggggtct 18
 <210> 6
 <211> 18
- 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 6
- 35 tagggataac agggagga 18
 <210> 7

ES 2 664 218 T3

<211> 22
<212> ADN
<213> Rattus rattus
<400> 7
5 caactgatcc tgaggagtc gg 22
<210> 8
<211> 22
<212> ADN
<213> Rattus rattus
10 <400> 8
caaaacgtcg tgagacagtt tg 22
<210> 9
<211> 22
<212> ADN
15 <213> Rattus rattus
<400> 9
aaaaatgtcc ttgaaggttc ag 22
<210> 10
<211> 15
20 <212> ADN
<213> Rattus rattus
<400> 10
agacaggggg ctctc 15
<210> 11
25 <211> 7
<212> PRT
<213> Rattus rattus
<400> 11

Asn Lys Val Gly Leu Ile Glu

1

5

30 <210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Rattus rattus
<400> 12

ES 2 664 218 T3

Thr Ser Ser Asp Leu Ser Arg
1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Rattus rattus

<400> 13

Arg Ser Asp His Leu Ser Arg
1 5

<210> 14

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 14

Arg Ser Asp Asn Leu Ser Glu
1 5

<210> 15

15 <211> 7

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 15

Gln Asn Ala His Arg Lys Thr
1 5

20 <210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 16

Thr Gly Gly Glu Arg Pro
1 5

25

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Rattus rattus

30 <400> 17

ES 2 664 218 T3

Thr Gly Glu Lys Pro
1 5

<210> 18

<211> 15

<212> ADN

5 <213> Rattus rattus

<400> 18

aattggtgg ccatg 15

<210> 19

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 19

Arg Ser Asp Ala Leu Ser Thr
1 5

<210> 20

15 <211> 7

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 20

Asp Arg Ser Thr Arg Thr Lys
1 5

20 <210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 21

Arg Ser Asp Ala Leu Ala Arg
1 5

25 <210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Rattus rattus

30 <400> 22

Arg Ser Asp Ser Leu Ser Ala
1 5

ES 2 664 218 T3

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Rattus rattus

5 <400> 23

Thr Ser Ser Asn Arg Lys Thr

1

5

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

10 <213> Rattus rattus

<400> 24

Thr Gly Gly Gln Arg Pro
1 5

<210> 25

<211> 12

15 <212> ADN

<213> Rattus rattus

<400> 25

gttctgtag tt 12

<210> 26

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 26

Arg Ser Ala Asn Leu Ala Arg
1 5

25 <210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 27

Arg Ser Asp Asn Leu Arg Glu
1 5

30

<210> 28

ES 2 664 218 T3

<211> 7

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 28

5

Thr Ser Gly Ser Leu Ser Arg
1 5

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Rattus rattus

10 <400> 29

Gln Ser Gly Ser Leu Thr Arg
1 5

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Rattus rattus

<400> 30

Arg Ser Asp Val Leu Ser Glu
1 5

<210> 31

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 31

Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gln Arg Pro
1 5

<210> 32

25 <211> 6

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 32

Thr Gly Ser Gln Lys Pro
1 5

30 <210> 33

ES 2 664 218 T3

<211> 18

<212> ADN

<213> Rattus rattus

<400> 33

5 gaagtcatgc aggggtgc 18

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Rattus rattus

10 <400> 34

Asp Arg Ser Ala Leu Ser Arg
1 5

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Rattus rattus

<400> 35

Thr Ser Gly His Leu Ser Arg
1 5

<210> 36

<211> 7

20 <212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 36

Arg Ser Asp Asn Leu Ser Thr
1 5

<210> 37

25 <211> 7

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 37

His Asn Ala Thr Arg Ile Asn
1 5

30 <210> 38

<211> 7

ES 2 664 218 T3

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 38

Thr Ser Gly Ser Leu Thr Arg
1 5

5 <210> 39

<211> 15

<212> ADN

<213> Rattus rattus

<400> 39

10 ggtgccattg ggggtg 15

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Rattus rattus

15 <400> 40

Arg Ser Asp His Leu Ser Thr
1 5

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

20 <213> Rattus rattus

<400> 41

His Ser Asn Ala Arg Lys Asn
1 5

<210> 42

<211> 7

25 <212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 42

Glu Arg Gly Thr Leu Ala Arg
1 5

<210> 43

30 <211> 7

<212> PRT

<213> Rattus rattus

ES 2 664 218 T3

<400> 43

Gln Ser Gly Asn Leu Ala Arg
1 5

<210> 44

<211> 15

5 <212> ADN

<213> Rattus rattus

<400> 44

gctgtgggtg tggt 15

<210> 45

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 45

Gln Ser Ser Asp Leu Ser Arg
1 5

15 <210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 46

Arg Ser Asp Ala Leu Thr Gln
1 5

20

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Rattus rattus

25 <400> 47

Arg Ser Asp Ala Leu Ser Arg
1 5

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Rattus rattus

<400> 48

Asp Arg Ser Asp Leu Ser Arg
1 5

ES 2 664 218 T3

<210> 49
<211> 16
<212> ADN
<213> Rattus rattus
5 <400> 49
accatgtgtg gcaggg 16
<210> 50
<211> 7
<212> PRT
10 <213> Rattus rattus
<400> 50

Arg Ser Ala His Leu Ser Arg
1 5

<210> 51
<211> 7
15 <212> PRT
<213> Rattus rattus
<400> 51

Gln Ser Gly Asp Leu Thr Arg
1 5

<210> 52
20 <211> 7
<212> PRT
<213> Rattus rattus
<400> 52

Arg Ser Asp Thr Leu Ser Val
1 5

25 <210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> Rattus rattus
<400> 53

Asp Asn Ser Thr Arg Ile Lys
1 5

30 <210> 54
<211> 16

ES 2 664 218 T3

<212> ADN
<213> Rattus rattus
<400> 54
gaggaccgtg gacaag 16
5 <210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> Rattus rattus
<400> 55

10 Arg Ser Ala Asn Leu Ser Val
1 5
<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> Rattus rattus
15 <400> 56

Asp Arg Ala Asn Leu Ser Arg
1 5
<210> 57
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Rattus rattus
<400> 57

Arg Ser Asp Asp Leu Thr Arg
1 5
<210> 58
<211> 22
25 <212> ADN
<213> Rattus rattus
<400> 58
gtttgcagc actctgtcaa ac 22

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la integración dirigida de un locus de inmunoglobulina (Ig) artificial en una célula germinal no humana receptora, un ovocito fertilizado o un embrión que comprende: introducción en una célula germinal no humana receptora, un ovocito fertilizado o un embrión de una meganucleasa específica de sitio que dirige un locus de Ig endógeno y un vector transgénico que comprende un locus de Ig artificial de manera que el locus de Ig artificial se integra en el genoma de la célula germinal no humana receptora, el ovocito fertilizado o el embrión mediante integración dirigida y reemplaza el locus de Ig endógeno o partes del mismo; por recombinación homóloga; en el que la meganucleasa aumenta la frecuencia de la recombinación homóloga a través de la escisión de ADN de doble cadena.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la meganucleasa se proporciona en una construcción de expresión regulable.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la meganucleasa está operativamente unida a un promotor inducible.
- 15 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además seleccionar una célula en la que el locus de Ig artificial se ha integrado en el sitio dirigido y en el que una construcción de expresión de meganucleasas regulable se ha integrado en el genoma.
- 20 5. El procedimiento de la reivindicación 4, que comprende además fusionar la célula seleccionada con una célula de la unidad de transferencia nuclear enucleada que es no humana, totipotente y capaz de formar un neonato funcional, para formar una célula resultante.
6. El procedimiento de la reivindicación 4 o 5, en el que la célula de la unidad de transferencia nuclear enucleada es un ovocito o una célula madre embrionaria.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende, además:
 - i. inyectar la célula seleccionada en un embrión no humano en desarrollo; o
 - ii. cultivar la célula resultante en un medio apropiado y transferirla a la célula resultante en un receptor sincronizado para generar un animal transgénico no humano.
- 25 8. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el locus de Ig artificial comprende fragmentos de loci de Ig humanas y no humanas.
9. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el locus de Ig artificial comprende al menos un segmento génico V humano.
- 30 10. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que el locus de Ig artificial comprende múltiples segmentos génicos de inmunoglobulina, en el que los segmentos génicos comprenden al menos un segmento génico de la región V, uno o más segmentos génicos J, uno o más segmentos génicos D, y uno o más genes de la región constante.
- 35 11. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la secuencia diana de meganucleasa está presente en, o próxima a, los segmentos génicos seleccionados de: un segmento génico J; y un segmento génico de región constante.
- 40 12. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, que comprende además el uso de una segunda meganucleasa, en el que la segunda meganucleasa reconoce una segunda secuencia diana de meganucleasa presente en o próxima al locus de Ig endógeno y escinde selectivamente el locus de Ig endógeno junto con la primera meganucleasa, pero en un sitio distinto del de la primera meganucleasa, inactivando así al menos un locus de Ig endógeno.
- 45 13. Un animal transgénico no humano, que se puede obtener mediante el procedimiento de la reivindicación 9, en el que el animal comprende:
 - i. al menos una construcción de expresión de meganucleasa genómica regulable; y
 - ii. un locus de Ig artificial que reemplaza un locus de Ig endógeno;
 en el que el animal es capaz de producir un anticuerpo que tiene un idiotipo humano.
14. El animal transgénico de la reivindicación 13, en el que el animal se selecciona de un ave, un roedor y una comadreja.
15. El animal transgénico de la reivindicación 14, en el que el animal es una rata.

16. Uso in vitro de un vector transgénico para integración dirigida,

en el que el vector transgénico comprende una región de control de la expresión inducible unida operativamente a un ácido nucleico que codifica una meganucleasa específica de sitio que se dirige a un locus de Ig endógeno,

en el que el uso comprende:

- 5 introducir el vector transgénico en una célula germinal no humana receptora, un ovocito fertilizado o un embrión de manera que el vector transgénico se integre en el genoma de la célula germinal, el ovocito fertilizado o el embrión; e introducir un vector transgénico que comprende un locus de Ig artificial en la célula germinal no humana receptora, el ovocito fertilizado o el embrión de manera que el locus artificial se integra en el genoma de la célula germinal no humana receptora, el ovocito fertilizado o el embrión mediante integración dirigida.

FIGURA 1



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

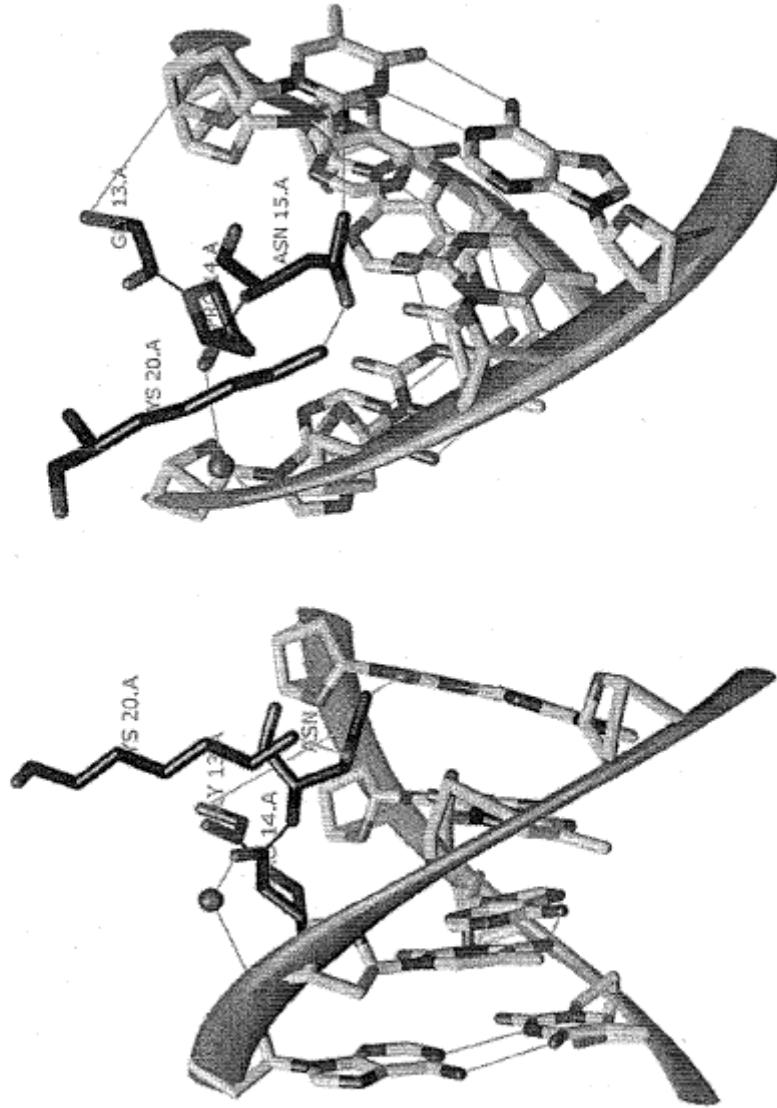


Figura 3. Interacción del extremo 5' de la secuencia de reconocimiento de I-SceI con I-SceI.

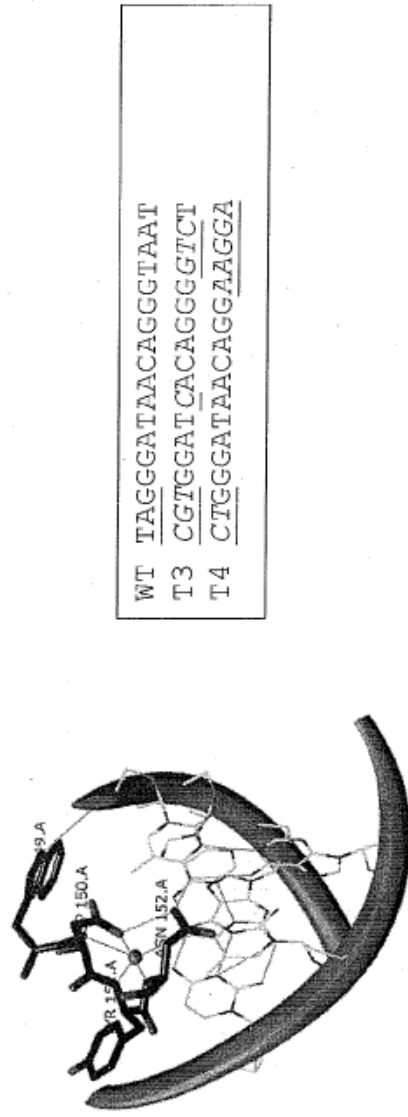


Figura 4. Mecanismo de reconocimiento de secuencia de I-Crel

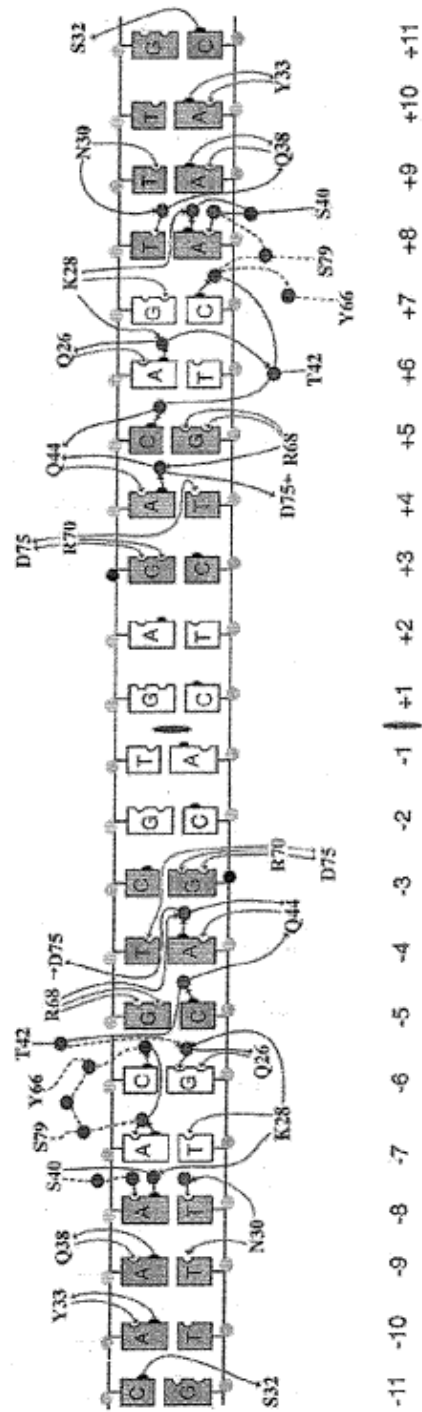


Figura 5. Diagrama esquemático de la estrategia para alterar la secuencia de reconocimiento de I-Crel

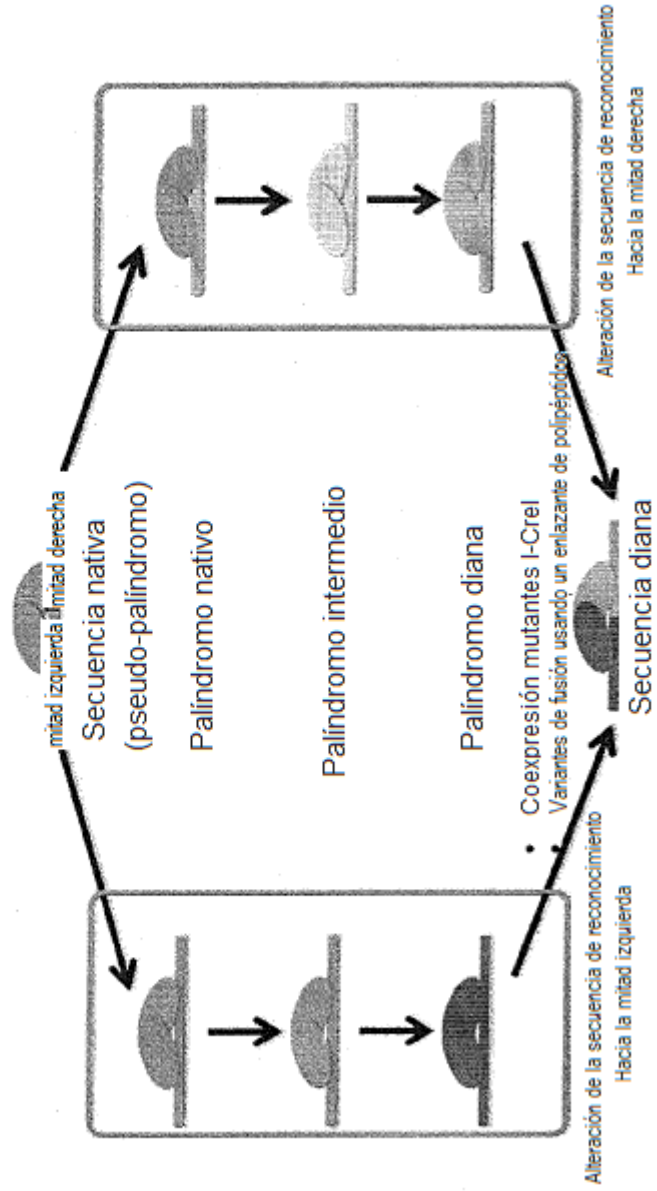


Figura 6

