

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 829**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2014 PCT/US2014/023076**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014 WO14164640**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2014 E 14718226 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 2967014**

54 Título: **Ratones transgénicos que expresan moléculas químéricas del complejo mayor de histocompatibilidad (mhc) de clase I**

30 Prioridad:

11.03.2013 US 201313793812

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

04.06.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MACDONALD, LYNN;
MURPHY, ANDREW J.;
GURER, CAGAN;
MCWHIRTER, JOHN;
VORONINA, VERA;
HARRIS, FAITH;
STEVENS, SEAN y
XUE, YINGZI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 764 829 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ratones transgénicos que expresan moléculas quiméricas del complejo mayor de histocompatibilidad (mhc) de clase I

5

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de Estados Unidos n.º 13/793.812 presentada el 11 de marzo, 2013.

10

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un roedor genéticamente modificado (por ejemplo, un ratón o una rata), que expresa una molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase I humana o humanizada. La invención también se refiere a un roedor genéticamente modificado, por ejemplo, un ratón o una rata, que expresa una proteína MHC I humana o humanizada (p. ej., cadena α de MHC I) y/o una β 2 microglobulina humana o humanizada. La invención proporciona adicionalmente métodos para producir un ratón genéticamente modificado que expresa la proteína MHC de clase I humana o humanizada (p. ej., cadena α de MHC I) y/o β 2 microglobulina. También se proporcionan métodos para modificar un locus de MHC I y/o de β 2 microglobulina de un ratón, para expresar una MHC I y/o β 2 microglobulina humana o humanizada.

20

Antecedentes de la invención

En la respuesta inmunoadaptativa, se reconocen antígenos extraños por las moléculas receptoras en los linfocitos B (por ejemplo, inmunoglobulinas) y linfocitos T (por ejemplo, receptor de linfocitos T o TCR). Estos antígenos extraños se presentan sobre la superficie de células como fragmentos peptídicos mediante proteínas especializadas, referidas genéricamente como moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Las moléculas MHC se codifican por múltiples loci que se encuentran como una agrupación enlazada de genes que abarcan aproximadamente 4 Mb. En ratones, los genes MHC se encuentran en el cromosoma 17 y por razones históricas se denominan como los genes de histocompatibilidad 2 (H-2). En seres humanos, los genes se encuentran en el cromosoma 6 y se denominan genes de antígeno leucocitario humano (HLA). Los loci en ratones y seres humanos son poligénicos; incluyen tres clases altamente polimórficas de genes MHC (clase I, II y III) que muestran una organización similar en genomas humanos y murinos (véase FIG. 2 y FIG. 3, respectivamente).

25

30

35

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

40

Tanto los seres humanos como los ratones tienen genes de MHC de clase I (véase, FIG. 2 y FIG. 3). En seres humanos, los genes de clase I clásicos se denominan HLA-A, HLA-B y HLA-C, mientras que en ratones son H-2K, H-2D y H-2L. Las moléculas de clase I consisten en dos cadenas: una cadena α polimórfica (a veces referida como a cadena pesada) y una cadena más pequeña denominada β 2-microglobulina (también conocida como cadena ligera), que generalmente no es polimórfica (FIG. 1). Estas dos cadenas forman un heterodímero no covalente sobre la superficie celular. La cadena α contiene tres dominios (α 1, α 2 y α 3). El exón 1 del gen de la cadena α codifica la secuencia líder, los exones 2 y 3 codifican los dominios α 1 y α 2, el exón 4 codifica el dominio α 3, el exón 5 codifica el dominio transmembrana y los exones 6 y 7 codifican la cola citoplasmática. La cadena α forma una hendidura de unión a péptidos que implica los dominios α 1 y α 2 (que se parecen a dominios tipo Ig) seguidos por el dominio α 3, que es similar a la β 2-microglobulina.

45

50

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

55

Las moléculas MHC de clase I se expresan en todas las células nucleadas, incluyendo células tumorales. Se expresan específicamente sobre linfocitos T y B, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, entre otras células y funcionan en presentar fragmentos peptídicos (generalmente de 8-10 aminoácidos de longitud) sobre la superficie de linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL por sus siglas en inglés). Los CTL están especializados en destruir cualquier célula que porte un péptido enlazado a MHC I reconocido por su propio TCR enlazado a membrana. Cuando una célula presenta péptidos derivados de proteínas celulares que no presenta normalmente (por ejemplo, de origen vírico, tumoral o de otro no propio), tales péptidos se reconocen mediante los CTL, que se activan y destruyen la célula que presenta el péptido.

60

65

Generalmente, la presentación de proteínas normales (es decir, propias) en el contexto de las moléculas MHC I no desencadena la activación de CTL debido a los mecanismos de tolerancia. Sin embargo, en algunas enfermedades (por ejemplo, cáncer, enfermedades autoinmunitarias) los péptidos derivados de algunas proteínas propias se convierten en la diana del componente celular del sistema inmunitario, lo que da como resultado la destrucción de las células que presentan tales péptidos. Aunque se ha avanzado en el reconocimiento de algunos antígenos derivados de sí mismos que desencadenan la respuesta inmunitaria celular (p. ej., Antígenos asociados con varios tipos de cáncer), para mejorar la identificación de péptidos reconocidos por los CTL humanos a través de las moléculas MHC de clase I, sigue existiendo la necesidad de sistemas tanto *in vivo* como *in vitro* que imiten aspectos del sistema inmunitario celular humano. Los sistemas que imitan el sistema inmunitario celular humano pueden usarse para identificar antígenos asociados a enfermedades para desarrollar agentes terapéuticos humanos, por ejemplo, vacunas y otros agentes biológicos. Los sistemas para evaluar el reconocimiento de antígenos en el contexto del sistema inmunitario humano pueden ayudar a identificar poblaciones de CTL terapéuticamente útiles (por ejemplo, útiles para estudiar y combatir enfermedades humanas). Dichos sistemas también pueden ayudar a potenciar la actividad de las poblaciones de CTL humanos para combatir de manera más eficaz las infecciones y las entidades extrañas que portan antígenos. Por consiguiente, existe la necesidad de sistemas biológicos (por ejemplo, animales modificados por ingeniería genética) que puedan generar un sistema inmunitario que presente componentes que imiten la función del sistema inmunitario humano.

20 Sumario de la invención

Se proporciona un sistema biológico para generar o identificar péptidos que se asocian con proteínas MHC de clase I humanas y quimeras de las mismas y se unen linfocitos T CD8+. Se proporcionan células de roedores que expresan moléculas humanas o humanizadas que funcionan en la respuesta inmunitaria celular. También se proporcionan loci de roedores humanizados que codifican proteínas de MHC I y $\beta 2$ microglobulina humanas o humanizadas. También se describen células de roedores humanizadas que expresan moléculas MHC y $\beta 2$ microglobulina humanas o humanizadas. Se proporcionan sistemas *in vivo* que comprenden células de roedores humanizadas, en donde las células de roedores expresan una o más moléculas del sistema inmunitario humanas o humanizadas.

En el presente documento se proporciona un ratón, que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón, en donde una porción humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido HLA-B27 humano. De manera específica, en el presente documento se proporciona un ratón que comprende en un locus H-2D endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón, en donde una porción humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido HLA-B27 humano y en donde el animal expresa el polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón. En un aspecto, el animal no expresa un dominio extracelular (por ejemplo, un dominio extracelular funcional) de un polipéptido de MHC I de ratón endógeno a partir de un locus de MHC I de ratón endógeno. En un aspecto de la invención, un roedor comprende dos copias del locus de MHC I que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano/de roedor, por ejemplo, humano/de rata. En otro aspecto de la invención, el ratón comprende una copia del locus de MHC I que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón. Por consiguiente, el roedor puede ser homocigoto o heterocigoto para el locus de MHC I que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido MHC I quimérico humano/de roedor. En diversas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón está comprendida en la línea germinal del ratón. En una realización, el locus quimérico MHC I está comprendido en la línea germinal de un roedor.

En un aspecto, la secuencia de nucleótidos que codifica el MHC I quimérico humano/de roedor está operativamente unida a elementos reguladores endógenos no humanos, por ejemplo, promotor, potenciador, silenciador, etc. En una realización, una porción humana del polipéptido quimérico comprende una secuencia líder humana. En otra realización, el polipéptido quimérico comprende una secuencia líder no humana, por ejemplo, una secuencia líder endógena no humana. En una realización adicional, la porción humana del polipéptido quimérico comprende dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del polipéptido de MHC I humano. El polipéptido de MHC I humano puede seleccionarse del grupo que consiste en HLA-A, HLA-B y HLA-C. En una realización, el polipéptido de MHC I humano es un polipéptido HLA-a, por ejemplo, polipéptido HLA-A2, por ejemplo, un polipéptido HLA-A2.1. En otra realización, el polipéptido de MHC I humano es un polipéptido HLA-B, por ejemplo, el polipéptido HLA-B27.

El animal no humano modificado por ingeniería genética es un roedor. En una realización, el roedor es un ratón. Por consiguiente, en una realización, el locus endógeno no humano es un locus de ratón, por ejemplo, un locus H-2K, H-2D o H-2L de ratón. En una realización, la porción de roedor del polipéptido de MHC I quimérico humano/no humano comprende dominios de transmembrana y citoplasmáticos del polipéptido de MHC I no humano endógeno. Por consiguiente, en un ejemplo en donde el animal no humano es un ratón, el locus de MHC I endógeno no humano puede ser un locus H-2K (por ejemplo, locus H-2Kb) y un polipéptido de MHC I no humano endógeno puede ser un polipéptido H-2K; por lo tanto, el polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón puede comprender dominios transmembrana y citoplasmáticos del polipéptido H-2K. En otra realización en donde el animal no humano es un ratón, el locus de MHC I endógeno no humano puede ser un locus H-2D y el polipéptido de MHC I no humano endógeno es un polipéptido H-2D; por lo tanto, el polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón comprende dominios

transmembrana y citoplasmáticos del polipéptido H-2D. De manera similar, en otro ejemplo, el locus de MHC I endógeno no humano puede ser un locus H-2L de ratón y un polipéptido de MHC I no humano endógeno puede ser un polipéptido H-2L; por lo tanto, el polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón puede comprender dominios transmembrana y citoplasmáticos del polipéptido H-2L.

5 En el presente documento se divulga un ratón que comprende en un locus H-2K endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón, en donde una porción humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido HLA-A humano (por ejemplo, HLA-A2) y una porción de ratón comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido H-2K de ratón y en
10 donde el ratón expresa el polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón. En algunos ejemplos, el ratón no expresa un dominio extracelular (por ejemplo, no expresa un dominio extracelular funcional) del polipéptido H-2K de ratón a partir de un locus H-2K endógeno. En un aspecto, la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón está operativamente unida a elementos reguladores endógenos de ratón. La porción humana del polipéptido quimérico comprende una secuencia líder humana. También comprende los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del polipéptido de MHC I humano. El polipéptido de MHC I humano puede ser un polipéptido HLA-A, por ejemplo, el polipéptido HLA-A2.1. En un aspecto, el locus H-2K de ratón es un locus H-2Kb.

En el presente documento se proporciona un ratón que comprende en un locus H-2D endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón, en donde una porción humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido HLA-B27 humano y una porción de ratón comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido H-2D de ratón (por ejemplo, H-2D1) y en
20 donde el ratón expresa el polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón. En algunas realizaciones, el ratón no expresa un dominio extracelular (por ejemplo, un dominio extracelular funcional) del polipéptido H-2D de ratón a partir de un locus H-2D endógeno. En un aspecto, la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón está operativamente unida a elementos reguladores endógenos de ratón. La porción humana del polipéptido quimérico comprende una secuencia líder humana. El polipéptido quimérico también puede comprender una secuencia líder de ratón. La porción humana del polipéptido quimérico también puede comprender dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del polipéptido de MHC I humano. El polipéptido de MHC I humano es un polipéptido HLA-B27. En un aspecto, el locus H-2D de ratón es un locus H-2D1.

30 En una realización adicional, en el presente documento se proporciona un ratón que comprende en un locus H-2D de ratón endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón, en donde la porción humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de un HLA-B27 humano. En otra realización, en el presente documento se proporciona un roedor que comprende en un locus de MHC I endógeno dos o más, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis, secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de MHC I quimérico humanos/de roedor, en donde una porción humana de los polipéptidos quiméricos comprende un dominio extracelular de un polipéptido de MHC I humano, en donde una porción de roedor de polipéptidos de MHC I quimérico humano/de roedor comprende dominio transmembrana y citoplasmático de un polipéptido de MHC I de roedor y en
35 donde el roedor expresa dos o más, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis, polipéptidos de MHC I quimérico humano/de roedor. Por consiguiente, los polipéptidos de MHC I de roedores pueden seleccionarse de H-2D, H-2K y H-2L. En una realización, los polipéptidos de MHC I quimérico humano/de roedor pueden seleccionarse de HLA-A2/H-2K, HLA-A3/H-2K, HLA-B27/H-2D, HLA-B7/H-2D y una combinación de los mismos. En una realización, dos, o tres polipéptidos de MHC I quimérico humano/de roedor pueden codificarse en cada cromosoma hermano 17; por lo tanto, un locus de MHC I de roedor puede comprender dos o más, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis, secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de MHC I quimérico humano/de roedor. En una realización, el roedor comprende dos secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos de MHC I quimérico humano/de roedor, en donde las dos secuencias de nucleótidos codifican los polipéptidos HLA-A2/H-2K y HLA-B27/H-2D, y en donde el roedor expresa los polipéptidos quiméricos HLA-A2 /H-2K y HLA-B27/H-2D. En una realización, el roedor proporcionado en el presente documento no expresa ningún polipéptido de MHC I de roedor endógeno funcional del locus de MHC I de roedor endógeno. Por consiguiente, en un aspecto, el roedor únicamente expresa humanizados, por ejemplo, polipéptidos de MHC I quimérico humano/de roedor, y los loci MHC I restantes que no comprenden secuencias quiméricas de MHC I humanos/de roedor (por ejemplo, loci MHC I que no comprenden el reemplazo de secuencias de nucleótidos de MHC I de roedor endógeno con aquellos que codifican polipéptidos quiméricos humanos/de roedor) se eliminan por delección. En otra realización, el roedor conserva una secuencia de nucleótidos
45 que codifica un polipéptido de MHC I de roedor endógeno funcional (por ejemplo, polipéptido H-2L).

Otro aspecto de la invención se refiere a un roedor (por ejemplo, un ratón o una rata), que comprende además en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. Por consiguiente, en el presente documento se proporciona un roedor que comprende en un locus de $\beta 2$ microglobulina no humana endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada, en donde el animal expresa el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. En un aspecto, el roedor no expresa un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina no humano endógeno funcional a partir de un locus de $\beta 2$ microglobulina no humano endógeno. En un aspecto, el roedor comprende dos copias del locus de $\beta 2$ microglobulina que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada; en otra realización, el roedor comprende una
60 copia del locus de $\beta 2$ microglobulina que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. Por consiguiente, el roedor puede ser homocigoto o heterocigoto para el locus de $\beta 2$ microglobulina que codifica el

polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. En diversas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada está comprendida en la línea germinal del roedor (por ejemplo, rata o ratón). En una realización, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de $\beta 2$ microglobulina humana. En una realización, el polipéptido es capaz de unirse a una proteína MHC I.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada está operativamente unido a elementos reguladores de $\beta 2$ microglobulina de roedor endógenos. En un aspecto, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en el exón 2 al exón 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana. En otro aspecto, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada comprende secuencias de nucleótidos expuestas en los exones 2, 3 y 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana. En un aspecto adicional, la secuencia de nucleótidos también comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en el exón 1 de un gen de $\beta 2$ microglobulina no humana. El animal no humano es un roedor (por ejemplo, un ratón o una rata); por lo tanto, el locus de $\beta 2$ microglobulina no humana es un locus de $\beta 2$ microglobulina de roedor (por ejemplo, un ratón o una rata).

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

La invención proporciona además un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido MHC I quimérico humano/ de roedor y una secuencia de nucleótidos que codifica una polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. En una realización, la invención proporciona un ratón que comprende en su genoma una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón, en donde una porción humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido HLA-B27 humano; y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada, en donde la primera secuencia de nucleótidos se encuentra en un locus H-2D endógeno, y la segunda secuencia de nucleótidos se encuentra en un locus de $\beta 2$ microglobulina no humana endógeno y en donde el animal expresa el polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón y el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. En un aspecto, el animal es un ratón. Por consiguiente, el locus de MHC I endógeno es un locus H-2D. En un ejemplo, el locus de ratón endógeno es un locus H-2K (por ejemplo, el locus H-2Kb). El locus ratón endógeno es un locus H-2D. En un ejemplo, el polipéptido de MHC I humano se selecciona del grupo que consiste en el polipéptido HLA-A, HLA-B y HLA-C. En un aspecto, el polipéptido de MHC I humano es HLA-A, por ejemplo, HLA-A2 (por ejemplo, HLA-A2.1). El polipéptido de MHC I humano es un HLA-B27. En diversas realizaciones, la primera y la segunda secuencia de nucleótidos están comprendidas en la línea germinal del ratón.

Por lo tanto, en un ejemplo, la invención proporciona un ratón que comprende en su genoma una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón, en donde una porción humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de un HLA-A humano (por ejemplo, HLA-A2) y una porción de ratón comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos de un H-2K de ratón; y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada, en donde la primera secuencia de nucleótidos se encuentra en un locus H-2K endógeno y la segunda secuencia de nucleótidos se encuentra en un locus de $\beta 2$ microglobulina de ratón endógeno y en donde el ratón expresa el polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón y el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. En una realización, la invención proporciona un ratón que comprende en su genoma una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón, en donde una porción humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de un HLA-B27 humano y una porción de ratón comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos de un H-2D de ratón; y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada, en donde la primera secuencia de nucleótidos se encuentra en un locus H-2D endógeno y la segunda secuencia de nucleótidos se encuentra en un locus de $\beta 2$ microglobulina de ratón endógeno y en donde el ratón expresa el polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón y el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. En una realización, el ratón que comprende tanto el polipéptido de MHC I quimérico como el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada no expresa un dominio extracelular (por ejemplo, un dominio extracelular

funcional) de un polipéptido MHC I no humano endógeno (por ejemplo, el polipéptido H-2K o H-2D de ratón) y/o unos polipéptidos de $\beta 2$ microglobulina endógenos funcionales no humanos (por ejemplo, de ratón) de sus respectivos loci endógenos. En un aspecto, el ratón comprende dos copias de cada una de la primera y la segunda secuencia de nucleótidos. En otro aspecto, el ratón comprende una copia de la primera y una copia de la segunda secuencia de nucleótidos. Por consiguiente, el ratón puede ser homocigoto o heterocigoto tanto para la primera como para la segunda secuencia de nucleótidos.

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

Adicionalmente, en el presente documento se proporciona un roedor que comprende en su genoma, por ejemplo, en su locus de MHC I endógeno, dos o más, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis, secuencias de nucleótidos que codifican unos polipéptidos de MHC I quimérico humano/de roedor y que además comprende en su locus endógeno de $\beta 2$ microglobulina una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. En una realización, la porción humana de los polipéptidos de MHC I quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido de MHC I humano y una porción de roedor comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido de MHC I de roedor. Por consiguiente, el ratón puede expresar dos o más, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis, polipéptidos de MHC I quimérico humano/de roedor y un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada.

También se proporcionan métodos para producir ratones modificado por ingeniería genética descritos en el presente documento. Por consiguiente, en una realización, se proporciona un método para modificar el locus H-2D de un ratón para expresar un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón, en donde el método comprende reemplazar en el locus H-2D endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de un polipéptido H-2D de ratón con una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de un polipéptido HLA-B27 humano. En el presente documento se divulga un método para modificar un locus de $\beta 2$ microglobulina de un animal no humano, por ejemplo, un roedor (por ejemplo, un ratón o una rata) para expresar un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada, en donde el método comprende reemplazar en el locus de $\beta 2$ microglobulina no humano endógeno, por ejemplo, de roedor (por ejemplo, ratón o rata) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina no humana, por ejemplo de roedor (por ejemplo, un ratón o una rata) con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. En dichos métodos, el reemplazo se puede realizar en una sola célula ES (por sus siglas en inglés), y la célula ES única se puede introducir en un embrión de ratón para producir un ratón. El ratón resultante puede criarse para generar un animal doblemente humanizado.

En el presente documento se divulga un método para producir animales doblemente humanizados, por ejemplo, roedores (por ejemplo, ratones o ratas). En un ejemplo, se proporciona un método para producir un ratón genéticamente modificado que comprende (a) modificar un locus de MHC I de un primer ratón para expresar un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón que comprende reemplazar en el locus de MHC I de ratón endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de un polipéptido de MHC I de ratón con una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de un polipéptido de MHC I humano, (b) modificar un locus de $\beta 2$ microglobulina de un segundo ratón para expresar un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada que comprende reemplazar en el locus de $\beta 2$ microglobulina de ratón endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina de ratón con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada; y (c) cruzar el primer y el segundo ratón para generar un ratón genéticamente modificado que comprende en su genoma una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada, en donde el ratón genéticamente modificado expresa el polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón y el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. En algunos ejemplos, el locus de MHC I se selecciona entre H-2K, H-2D y H-2L; en algunos ejemplos, el polipéptido de MHC I humano se selecciona de HLA-A, HLA-B y HLA-C. En un Ejemplo, el locus de MHC I es un locus H-2K, el polipéptido de MHC I humano es HLA-A (por ejemplo, HLA-A2), y el ratón expresa un polipéptido quimérico HLA-A/H-2K (por ejemplo, polipéptido HLA-A2/H-2K). En un aspecto, el polipéptido quimérico HLA-A2/H-2K comprende un dominio extracelular del polipéptido HLA-A2 y dominios citoplasmáticos y transmembrana del polipéptido H-2K. En otro ejemplo, el locus de MHC I es un locus H-2D, el polipéptido de MHC I humano es HLA-B (por ejemplo, HLA-B27), y el ratón expresa un polipéptido quimérico HLA-B2/H-2D (por ejemplo, polipéptido HLA-B27/H-2D). En un ejemplo, el polipéptido quimérico HLA-B27/H-2D comprende un dominio extracelular del polipéptido HLA-B27 y dominios citoplasmáticos y transmembrana del polipéptido H-2D. En un aspecto, la segunda secuencia de nucleótidos comprende secuencias de

nucleótidos expuestas en los exones 2, 3 y 4 (p. ej., exón 2 a exón 4) de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana, y una secuencia de nucleótidos expuesta en el exón 1 de un gen de $\beta 2$ microglobulina de ratón.

5 También se proporciona en el presente documento un locus de MHC I quimérico que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón, que comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de MHC I humano operativamente unido a una segunda secuencia de nucleótidos que codifica dominios transmembrana y citoplasmáticos de MHC I no humano. El locus de MHC I quimérico está en una posición de H-2D endógeno en un genoma de un ratón. El locus quimérico H-2D expresa un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón. El MHC I humano es HLA-B27, el MHC I de ratón es H-2D. En una realización, el locus quimérico H-2D expresa uno o más polipéptidos de MHC I quimérico humano/de ratón.

15 También se divulga, en el presente documento, un locus de $\beta 2$ microglobulina endógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. En un aspecto, el locus comprende una primera secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia expuesta en los exones 2, 3 y 4 (p. ej., exones 2-4) de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana, y una segunda secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia expuesta en el exón 1 de un gen de $\beta 2$ microglobulina de roedor. En una realización, la segunda secuencia de nucleótidos está operativamente unida a la primera secuencia de nucleótidos. En un ejemplo, El locus de $\beta 2$ microglobulina genéticamente modificado está en una posición de $\beta 2$ microglobulina endógena en un genoma de un roedor. En un aspecto, el locus de $\beta 2$ microglobulina genéticamente modificado expresa un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada.

25 En un aspecto, el locus de MHC I quimérico no humano se puede obtener mediante cualquier método descrito en el presente documento para generar animales no humanos genéticamente modificado (p. ej., roedores, por ejemplo, ratones o ratas). El locus de $\beta 2$ microglobulina genéticamente modificado se puede obtener mediante cualquier método descrito en el presente documento para generar animales no humanos modificado por ingeniería genéticas (p. ej., roedores, por ejemplo, ratones o ratas).

30 También se divulgan, en el presente documento, células, por ejemplo, células presentadoras de antígeno aisladas, derivadas de animales no humanos (por ejemplo, roedores, por ejemplo, ratones o ratas) descritos en el presente documento. Se divulgan también tejidos y embriones derivados de animales no humanos descritos en el presente documento.

35 En otro ejemplo más, la invención proporciona métodos para la identificación de antígenos o epítomos de antígenos que desencadenan la respuesta inmunitaria, métodos para evaluar un candidato a vacuna, métodos para la identificación de linfocitos T de alta afinidad con patógenos humanos o antígenos de cáncer.

40 Cualquiera de las realizaciones y aspectos descritos en el presente documento pueden utilizarse juntos entre sí, salvo que se indique otra cosa o sea evidente a partir del contexto. Otras realizaciones serán evidentes para un experto en la materia a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada. La siguiente descripción detallada incluye representaciones a modo de ejemplo de las diversas realizaciones de la invención, que no son restrictivas de la invención tal como se reivindica. Las figuras acompañantes constituyen una porción de la presente memoria descriptiva y, junto con la descripción, sirven únicamente para ilustrar las realizaciones y no para limitar la invención.

45 Breve descripción de los dibujos

La **FIG. 1** es un dibujo esquemático de los cuatro dominios de una molécula MHC de clase I: cadena α que contiene los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ y el cuarto dominio no covalentemente asociado, $\beta 2$ -microglobulina ($\beta 2m$). El círculo gris representa un péptido unido en las hendiduras de unión a péptidos.

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

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

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

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

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

5 La **FIG. 6B** es un gráfico de puntos de expresión *in vivo* de la proteína quimérica HLA-A2/H-2K en un ratón heterocigoto que alberga un locus quimérico HLA-A2/H-2K.

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

15 La **FIG. 8** muestra un diagrama de puntos representativo de expresión de HLA de clase I y de $\beta 2$ microglobulina humana en células aisladas de la sangre de ratones de tipo silvestre (TS), ratones heterocigotos para HLA-A2/H-2K quimérico y ratones heterocigotos para HLA-A2 quimérico/H-2K y heterocigoto para $\beta 2$ microglobulina humanizada (doble heterocigoto; clase I/ $\beta 2$ m HET).

20 La **FIG. 9** muestra un histograma representativo de expresión de HLA de clase I (eje X) en células aisladas de la sangre de ratones tipo silvestre (TS), heterocigotos quiméricos HLA-A2/H-2K (clase I HET) y doble heterocigotos quiméricos HLA-A2/H2K/ $\beta 2$ microglobulina humanizada (clase I/ $\beta 2$ m HET).

25 La **FIG. 10** muestra los resultados de los ensayos IFN γ Elispot para linfocitos T humanos expuestos a células presentadoras de antígeno (APC) de ratones de tipo silvestre (APC TS) o de ratones heterocigotos tanto para HLA-A2/H-2K quimérico como para $\beta 2$ microglobulina humanizada (APC doble HET) en presencia de péptidos contra la gripe (izquierda) o EBV (derecha). El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de una vía con una Prueba Posterior de Comparación Múltiple de Tukey.

30 La **FIG. 11** es un diagrama esquemático (no a escala) de la estrategia de direccionamiento para producir un locus/quimérico HLA-B27/H-2D1 que exprese un dominio extracelular (en la realización particular representada, dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ humanos) de un gen HLA-B27 humano, y dominios líderes, transmembrana y citoplasmáticos de H-2D de ratón endógeno. También se incluyen las ubicaciones de las sondas utilizadas para la genotipificación (véase Tabla 2). hEX1 = exón1 humano; mEX1=exón 1 de ratón; h2, h3, h4 = exones 2, 3, y 4 humanos; m5, m6, m7, m8 = exones 5, 6, 7 y 8 de ratón; mTM = dominio transmembrana de ratón en m5. Cuando no se indica otra cosa, las secuencias de ratón se representan en negro y las secuencias humanas se representan en blanco.

35 **FIG. 12**, los dos gráficos superiores, muestran histogramas representativos de la expresión de HLA de clase I humana en células aisladas de la sangre de ratones tipo silvestre (TS; figura superior derecha) o heterocigotos quiméricos HLA-B27/H-2D heterocigoto /heterocigotos para $\beta 2$ microglobulina humanizada (B27/hB2M Het/Het; figura superior izquierda); los dos gráficos inferiores representan histogramas representativos de la expresión de $\beta 2$ microglobulina humana en células aisladas de la sangre de ratones TS o B27/hB2M Het/Het. MFI= intensidad de fluorescencia media; sec solo = tinción solamente de anticuerpos secundarios.

Descripción detallada de la invención

45 Definiciones

La presente invención proporciona roedores genéticamente modificados (por ejemplo, ratones, ratas que expresan polipéptidos de MHC I y opcionalmente de $\beta 2$ microglobulina humanos o humanizados; así como métodos para producir los mismos. A menos que se defina lo contrario, todos los términos y frases utilizadas en el presente documento incluyen los significados que los términos y las frases alcanzan en la técnica, salvo que se indique claramente lo contrario o sea claramente evidente a partir del contexto en el que se usa un término o frase.

El término "conservativa", cuando se usa para describir una sustitución conservativa de aminoácidos, incluye la sustitución de un resto de aminoácido por otro resto de aminoácido que tiene un grupo R de la cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). Se pueden conseguir sustituciones conservativas de aminoácidos modificando una secuencia de nucleótidos con el fin de introducir un cambio de nucleótidos que codificará la sustitución conservativa. En general, una sustitución conservativa de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de interés de una proteína, por ejemplo, la capacidad del HCM I de presentar un péptido de interés. Ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen cadenas laterales alifáticas tales como glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; cadenas secundarias hidroxil alifáticas tales como serina y treonina; cadenas secundarias que contienen amida tales como asparagina y glutamina; cadenas secundarias aromáticas tales como fenilalanina, tirosina y triptófano; cadenas laterales básicas tales como lisina, arginina e histidina; cadenas laterales ácidas tales como ácido aspártico y ácido glutámico; y, cadenas laterales que contienen azufre tales como cisteína y metionina. Los grupos de sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen, por ejemplo, valina/leucina/isoleucina, fenilalanina/arginina, lisina/arginina, alanina/valina, glutamato/aspartato, y asparagina/glutamina. En algunas realizaciones, una sustitución

de aminoácidos conservativa puede ser una sustitución de cualquier resto natural en una proteína con alanina, como se usa en, por ejemplo, mutagénesis por barrido de alanina. En algunas realizaciones, se realiza una sustitución conservativa que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica de PAM250 divulgada en Gonnet et al. ((1992) Exhaustive Matching of the Entire Protein Sequence Database, Science 256:1443-45). En algunas realizaciones, la sustitución es una sustitución moderadamente conservativa en donde la sustitución tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica de PAM250.

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

Un experto en la materia entenderá que en la adición a los restos de los ácidos nucleicos que codifican el polipéptido de MHC I humano o humanizado y/o $\beta 2$ microglobulina descritos en el presente documento, debido a la degeneración del código genético, otros ácidos nucleicos pueden codificar los polipéptidos de la invención. Por lo tanto, además de un roedor genéticamente modificado que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica polipéptidos de MHC I y/u opcionalmente de $\beta 2$ microglobulina con sustituciones de aminoácidos conservativas, también se proporciona un roedor cuyo genoma comprende una secuencia o secuencias de nucleótidos que difiere de la descrita en el presente documento debido a la degeneración del código genético.

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

Los términos "homología" u "homólogo" en referencia a las secuencias, por ejemplo, nucleótidos o secuencias de aminoácidos, significan dos secuencias que, tras la alineación y la comparación óptimos, son idénticas en, por ejemplo, al menos aproximadamente el 75 % de nucleótidos o aminoácidos, por ejemplo, al menos aproximadamente el 80 % de nucleótidos o aminoácidos, por ejemplo, al menos aproximadamente el 90-95% de nucleótidos o aminoácidos, por ejemplo, más del 97 % de nucleótidos o aminoácidos. Un experto en la materia entenderá que, para el direccionamiento de genes óptimo, la construcción de direccionamiento debe contener brazos homólogos a secuencias de ADN endógenas (es decir, "brazos de homología"); por lo tanto, se puede producir la recombinación homóloga entre la construcción de direccionamiento y la secuencia endógena dirigida.

La expresión "operativamente unido" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos de esta manera están en una relación que les permite funcionar en su manera prevista. Por tanto, una secuencia del ácido nucleico que codifica una proteína puede unirse operativamente a secuencias reguladoras (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencia silenciadora, etc.) con el fin de conservar la regulación de la transcripción adecuada. Además, varias porciones de la proteína quimérica o humanizada de la invención pueden unirse operativamente para conservar el plegado, procesamiento, direccionamiento, expresión y otras propiedades funcionales adecuados de la proteína en la célula. A menos que se indique otra cosa, varios dominios de las proteínas quiméricas o humanizadas de la invención se unen operativamente entre sí.

La expresión "complejo MHC I" o similares, tal como se usa en el presente documento, incluye el complejo entre el polipéptido de cadena α de MHC I y el polipéptido de $\beta 2$ -microglobulina. La expresión "polipéptido de MHC I" o similares, tal como se usa en el presente documento, incluye el polipéptido de cadena α de MHC I solo. Generalmente, las expresiones "MHC humano" y "HLA" se usan indistintamente.

El término "reemplazo", en referencia al reemplazo de genes se refiere a colocar material genético exógeno en un locus genético endógeno, reemplazando, por tanto la totalidad o una porción del gen endógeno con una secuencia del ácido nucleico ortólogo u homólogo. Como se demuestra en los Ejemplos a continuación, las secuencias de los ácidos nucleicos de loci endógenos que codifican porciones de polipéptidos de MHC I y $\beta 2$ microglobulina de ratón se reemplazaron por secuencias de nucleótidos que codifican porciones de polipéptidos de MHC I y $\beta 2$ microglobulina humanos, respectivamente.

"Funcional" como se usa en el presente documento, por ejemplo, en referencia a un polipéptido funcional, se refiere a un polipéptido que conserva al menos una actividad biológica normalmente asociada con la proteína natural. Por

ejemplo, en algunas realizaciones de la invención, un reemplazo en un locus endógeno (por ejemplo, reemplazo en un locus de MHC I y/u opcionalmente de $\beta 2$ microglobulina no humano endógeno) da como resultado un locus que fracasa en expresar un polipéptido endógeno funcional. De manera análoga, el término "funcional" como se usa en el presente documento en referencia al dominio extracelular de una proteína, se refiere a un dominio extracelular que conserva su funcionalidad, por ejemplo, en el caso de MHC I, la capacidad de unir un antígeno, la capacidad de unir un correceptor de linfocitos T, etc. En algunas realizaciones de la invención, el reemplazo en el locus de MHC endógeno da como resultado un locus que fracasa en expresar un dominio extracelular (por ejemplo, un dominio extracelular funcional) de un MHC endógeno mientras que expresa un dominio extracelular (por ejemplo, un dominio extracelular funcional) de un MHC humano.

Varios aspectos descritos a continuación en el presente documento para los animales no humanos con MHC I genéticamente modificados, por ejemplo, tipo de animal; cepas animales; tipos celulares; exploración, detección y otros métodos; métodos de uso; etc., serán aplicables a los animales con $\beta 2$ microglobulina y MHC I/ $\beta 2$ microglobulina modificados por ingeniería genéticas.

Animales con MHC I Genéticamente Modificados

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

Los genes MHC se categorizan en tres clases: clase I, clase II y clase III, todos los cuales se codifican o bien sobre el cromosoma 6 humano o sobre el cromosoma 17 de ratón. Un esquema de la organización relativa de las clases de MHC humano y de ratón se presenta en las FIG. 2 y 3, respectivamente. Los genes de MHC se encuentran entre los genes más polimórficos de los genomas de ratón y humano. Se supone que los polimorfismos de MHC son importantes para proporcionar una ventaja evolutiva; los cambios en la secuencia pueden dar como resultado diferencias en la unión peptídica que permite una mejor presentación de patógenos a linfocitos T citotóxicos.

La proteína MHC de clase I comprende un dominio extracelular (que comprende tres dominios: α_1 , α_2 y α_3), un dominio transmembrana y una cola citoplasmática. Los dominios α_1 y α_2 forman la hendidura de unión a péptidos, mientras que el α_3 interactúa con la $\beta 2$ -microglobulina.

Además a su interacción con la $\beta 2$ -microglobulina, el dominio α_3 interactúa con el correceptor TCR de CD8, facilitando la activación específica de antígeno. Aunque la unión del MHC de clase I al CD8 es de aproximadamente 100 veces más débil que la unión del TCR al MHC de clase I, la unión de CD8 potencia la afinidad de la unión a TCR. Wooldridge et al. (2010) MHC Class I Molecules with Superenhanced CD8 Binding Properties Bypass the Requirement for Cognate TCR Recognition and Nonspecifically Activate CTLs, *J. Immunol.* 184:3357-3366. De manera interesante, aumentar la unión del MHC de clase I a CD8 anuló la especificidad de antígeno en la activación de CTL. *Id.*

La unión de CD8 a moléculas MHC de clase I es específica de la especie; el homólogo de ratón de CD8, Lyt-2, mostró unir moléculas H-2D^d en el dominio α_3 , pero no unió moléculas HLA-A. Connolly et al. (1988) The Lyt-2 Molecule Recognizes Residues in the Class I α_3 Domain in Allogeneic Cytotoxic T Cell Responses, *J. Exp. Med.* 168:325-341. La unión de diferencias se debió supuestamente a determinantes tipo CDR (tipo CDR1 y CDR2) sobre CD8 que no se habían conservado entre humanos y ratones. Sanders et al. (1991) Mutations in CD8 that Affect Interactions with HLA Class I and Monoclonal Anti-CD8 Antibodies, *J. Exp. Med.* 174:371-379; Vitiello et al. (1991) Analysis of the HLA-restricted Influenza-specific Cytotoxic T Lymphocyte Response in Transgenic Mice Carrying a Chimeric Human-Mouse Class I Major Histocompatibility Complex, *J. Exp. Med.* 173:1007-1015; y, Gao et al. (1997) Crystal structure of the complex between human CD8 α and HLA-A2, *Nature* 387:630-634. Se ha indicado que CD8 une HLA-A2 en una región conservada en el dominio α_3 (en la posición 223-229). Una única sustitución (V245A) en HLA-A redujo la unión de CD8 a HLA-A, con una reducción grande concomitante en la lisis mediada por linfocitos T. Salter et al. (1989), Polymorphism in the α_3 domain of HLA-A molecules affects binding to CD8, *Nature* 338:345-348. En general, el polimorfismo en el dominio α_3 de las moléculas HLA-A también afectó la unión a CD8. *Id.* En ratones, la sustitución de aminoácidos en el resto 227 en H-2D^d afectó la unión de Lyt-2 de ratón a H-2D^d, y las células transfectadas con un H-2D^d mutante no fueron lisadas por los linfocitos T CD8⁺. Potter et al. (1989) Substitution at residue 227 of H-2 class I molecules abrogates recognition by CD8-dependent, but not CD8-independent, cytotoxic T lymphocytes, *Nature* 337:73-75.

Por lo tanto, debido a la especificidad a especies de la interacción entre el dominio α_3 de MHC de clase I y CD8, un complejo MHC I que comprende un reemplazo de un dominio α_3 de H-2K con un dominio α_3 de HLA-A2 humano no era funcional en un ratón (es decir, *in vivo*) en ausencia de un CD8 humano. En animales transgénicos para HLA-A2, la sustitución del dominio α_3 humano por el dominio α_3 de ratón dio como resultado la restauración de la respuesta de los linfocitos T. Irwin et al. (1989) Species-restricted interactions between CD8 and the α_3 domain of class I influence the magnitude of the xenogeneic response, *J. Exp. Med.* 170:1091-1101; Vitiello et al. (1991), *supra*.

El dominio transmembrana y la cola citoplasmática de proteínas MHC de clase I de ratón también tiene importantes funciones. Una función del dominio transmembrana de MHC I es facilitar la modulación por HLA-A2 de la adhesión de

- células homotípicas (para potenciar o inhibir la adhesión), supuestamente como resultado de la reticulación (o unión) de moléculas MHC de superficie. Wagner et al. (1994) Ligation of MHC Class I and Class II Molecules Can Lead to Heterologous Desensitization of Signal Transduction Pathways That Regulate Homotypic Adhesion in Human Lymphocytes, *J. Immunol.* 152:5275-5287. La adhesión celular puede verse afectada mediante mAb que se unen en diversos epítomos de la molécula HLA-A2, sugiriendo que existen múltiples sitios sobre HLA-A2 implicados en la modulación de la adhesión de células homotípicas; dependiendo del epítomo unido, el efecto puede ser potenciar o inhibir la adhesión dependiente de HLA-A2. *Id.*
- La cola citoplasmática, codificada por los exones 6 y 7 del gen MHC I, es supuestamente necesaria para la expresión adecuada sobre la superficie celular y para la inhibición mediada por LIR1 de la citotoxicidad de linfocitos NK. Gruda et al. (2007) Intracellular Cysteine Residues in the Tail of MHC Class I Proteins Are Crucial for Extracellular Recognition by Leukocyte Ig-Like Receptor 1, *J. Immunol.* 179:3655-3661. Se requiere una cola citoplasmática para la multimerización de al menos algunas moléculas MHC I mediante la formación de enlaces disulfuro sobre sus restos de cisteína y, de este modo, puede desempeñar un papel en la agrupación y reconocimiento por los linfocitos NK. Lynch et al. (2009) Novel MHC Class I Structures on Exosomes, *J. Immunol.* 183:1884-1891.
- El dominio citoplasmático de HLA-A2 contiene un resto de serina constitutivamente fosforilado y una tirosina fosforilable, aunque las moléculas HLA-A2 mutantes en células Jurkat que carecen de un dominio citoplasmático parecen normales en cuanto a expresión, asociación citoesquelética, agregación e internalización endocítica. Gur et al. (1997) Structural Analysis of Class I MHC Molecules: The Cytoplasmic Domain Is Not Required for Cytoskeletal Association, Aggregation, and Internalization, *Mol. Immunol.* 34(2):125-132. Las moléculas HLA-A2 truncadas que carecen del dominio citoplasmático se expresan aparentemente de forma normal y se asocian con $\beta 2$ microglobulina. *Id.*
- Sin embargo, varios estudios han demostrado que la cola citoplasmática es crítica en la trans migración intracelular, presentación de antígenos mediada por células dendríticas (DC por sus siglas en inglés) y sensibilización de CTL. Un resto de tirosina codificado por el exón 6 mostró requerirse para la trans migración de MHC I a través de compartimentos endosómicos, la presentación de antígenos exógenos y sensibilización de CTL; mientras que la eliminación del exón 7 causó la potenciación de las respuestas de CTL antiviricas. Lizee et al. (2003) Control of Dendritic Cross-Presentation by the Major Histocompatibility Complex Class I Cytoplasmic Domain, *Nature Immunol.* 4:1065-73; Basha et al. (2008) MHC Class I Endosomal and Lysosomal Trafficking Coincides with Exogenous Antigen Loading in Dendritic Cells, *PLoS ONE* 3: e3247; y Rodriguez-Cruz et al. (2011) Natural Splice Variant of MHC Class I Cytoplasmic Tail Enhances Dendritic Cell-Induced CD8+ T-Cell Responses and Boosts AntiTumor Immunity, *PLoS ONE* 6:e22939.
- En diversas realizaciones, la invención proporciona un roedor genéticamente modificado (por ejemplo, ratón, rata), que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC clase I humano o humanizado. El roedor puede comprender en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I que es parcialmente humano y parcialmente de roedor, por ejemplo, un animal roedor que expresa un polipéptido de MHC I quimérico humano/de roedor. En un aspecto, el roedor solo expresa el polipéptido de MHC I humano o humanizado, por ejemplo, polipéptido de MHC I quimérico humano/de roedor y no expresa una proteína MHC I no humana endógena (por ejemplo, una proteína MHC I endógena funcional no humana) a partir de un locus de MHC I endógeno.
- En una realización, en el presente documento se proporciona un roedor, por ejemplo, una rata o un ratón, que comprende en su genoma, por ejemplo, en un locus de MHC I no humano endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I humano. En una realización, en el presente documento se proporciona un ratón, que comprende en su genoma, en un locus H-2D endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano/no humano.
- En una realización, el polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón comprende en su porción humana un dominio de unión a péptidos de un polipéptido HLA-B27 humano. En un aspecto, la porción humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de un HLA-B27 humano. En esta realización, la porción humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de una cadena α de un HLA-B27 humano. La porción humana del polipéptido quimérico comprende dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$, y $\alpha 3$ de un HLA-B27 humano. En una realización, la porción humana del polipéptido quimérico (por ejemplo, dominio extracelular del polipéptido quimérico) comprende una secuencia líder humana. En otra realización, el polipéptido quimérico (por ejemplo, el dominio extracelular del polipéptido quimérico) comprende una secuencia líder no humana (por ejemplo, secuencia líder no humana endógena).
- El polipéptido de MHC I humano o humanizado puede derivar de una molécula HLA humana funcional codificada por los loci de HLA-B27. Una lista de antígenos y alelos de HLA comúnmente utilizados se describe en Shankarkumar et al. ((2004) The Human Leukocyte Antigen (HLA) System, *Int. J. Pharm. Genet.* 4(2):91-103). Shankarkumar et al. también presentan una breve explicación de la nomenclatura de HLA utilizada en la técnica. Se puede encontrar información adicional con respecto a la nomenclatura de HLA y diversos alelos de HLA en Holdsworth et al. (2009) The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens, *Tissue Antigens* 73:95-170, y una reciente actualización

de Marsh et al. (2010) Nomenclature for factors of the HLA system, 2010, Tissue Antigens 75:291-455. Por consiguiente, el polipéptido de MHC I humano o humanizado puede derivar de cualquiera de las moléculas HLA de clase I funcionales humanas descritas en dichas referencias.

5 En un aspecto específico, el polipéptido de MHC I humano o humanizado deriva de HLA-A humano. En una realización específica, el polipéptido HLA-A es un polipéptido HLA-A2 (por ejemplo, polipéptido HLA-A2.1). En una realización, el polipéptido HLA-A es un polipéptido codificado por un alelo HLA-A*0201, por ejemplo, alelo HLA-A*02:01:01:01. El alelo HLA-A*0201 se usa comúnmente entre la población norteamericana. Aunque los presentes Ejemplos describen esta secuencia de HLA particular, cualquier secuencia de HLA-A adecuada queda abarcada en el presente documento, por ejemplo, variantes polimórficas de HLA-A2 mostrada en población humana, secuencias con una o más modificaciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, secuencias de los ácidos nucleicos que difieren de la secuencia descrita en el presente documento debido a la degeneración del código genético, etc.

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

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

20 En otro aspecto específico, el polipéptido de MHC I humano o humanizado deriva de MHC I humano seleccionado entre HLA-B y HLA-C. En un aspecto, el MHC I humano o humanizado deriva de HLA-B, por ejemplo, HLA-B27. En otras realizaciones, el MHC I humano o humanizado deriva de HLA-A3, HLA-B7, HLA-B27, HLA-Cw6, etc.

25 Por consiguiente, en un aspecto, el MHC I humano o humanizado deriva de HLA-B. En una realización específica, el polipéptido HLA-B es un HLA-B27. En una realización, el polipéptido HLA-B27 es un polipéptido codificado por los subtipos B*2701-2759 de alelos de HLA-B27. El uso de HLA-B27 se correlaciona comúnmente con la espondilitis anquilosante en la población humana. Aunque los presentes Ejemplos describen esta secuencia de HLA particular, cualquier secuencia de HLA-B27 adecuada queda abarcada en el presente documento, por ejemplo, variantes polimórficas de HLA-B27 mostrada en población humana, secuencias con una o más modificaciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, secuencias de los ácidos nucleicos que difieren de la secuencia descrita en el presente documento debido a la degeneración del código genético, etc.

30 En un aspecto, se proporciona un roedor que expresa una secuencia de HLA-B27 humano, en donde la secuencia de HLA-B27 humano comprende una o más modificaciones conservativas o no conservativas.

35 En un aspecto, se proporciona un roedor que expresa una secuencia de HLA-B27 humano, en donde la secuencia de HLA-B27 humano es al menos aproximadamente un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de HLA-B27 humano. En una realización específica, la secuencia de HLA-B27 humano es al menos aproximadamente un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de HLA-B27 humano descrita en los Ejemplos. En una realización, la secuencia de HLA-B27 humano comprende una o más sustituciones conservativas. En una realización, la secuencia de HLA-B27 humano comprende una o más sustituciones no conservativas.

40 En un aspecto, la porción de roedor del polipéptido de MHC I quimérico humano/de roedor comprende dominios de transmembrana y/o citoplasmáticos del polipéptido de MHC I de roedor. El polipéptido de MHC I de roedor se selecciona de H-2K, H-2D y H-2L. En una realización, el polipéptido de MHC I de roedor es H-2K, por ejemplo, H-2Kb. En otra realización, el polipéptido de MHC I de roedor es H-2D, por ejemplo, H-2D1. Aunque se describen secuencias de H-2K y H-2E específicas en los Ejemplos, cualquier secuencia adecuada de H-2K y H-2D, por ejemplo, variantes polimórficas, sustituciones de aminoácidos conservativas/no conservativas, etc., están abarcadas en el presente documento.

45 El ratón descrito en el presente documento puede comprender en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I humano o humanizado, por ejemplo, polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica dicho polipéptido se localiza en un locus H-2D de ratón endógeno. En un aspecto, esto da como resultado un reemplazo de un gen MHC I endógeno o una porción del mismo con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I humano o humanizado, por ejemplo, dando como resultado un gen quimérico que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón descrito en el presente documento. En una realización, el reemplazo comprende un reemplazo de una secuencia de nucleótidos endógena que codifica un dominio de unión a péptidos de MHC I de ratón o un dominio extracelular de MHC I de ratón con una secuencia de nucleótidos de HLA-B27 humano que codifica el mismo. En esta realización, el reemplazo no comprende un reemplazo de una secuencia MHC I que codifica dominios transmembrana y/o citoplasmáticos de un polipéptido H-2D de ratón. Por consiguiente, el ratón contiene una secuencia de nucleótidos quimérica humana/de

ratón en un locus H-2D de ratón endógeno, y expresa el polipéptido de MHC quimérico humano/de ratón a partir del locus H-2D de ratón endógeno.

5 Un polipéptido quimérico humano/no humano puede ser tal que comprende una secuencia líder (señal) humana o no humana. En una realización, el polipéptido quimérico comprende una secuencia líder de una proteína MHC I humana, por ejemplo, de la proteína HLA-A2 (por ejemplo, secuencia líder de HLA-A2.1). Por consiguiente, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de MHC I quimérico puede estar operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder de MHC I humana.

10 En otra realización, el polipéptido quimérico comprende una secuencia líder no humana de una proteína MHC I, por ejemplo, una secuencia líder no humana de una proteína MHC I endógena. En una realización, el polipéptido quimérico comprende una secuencia líder de una proteína MHC I no humana, por ejemplo, la proteína H-2D de ratón (por ejemplo, secuencia líder de H-2D1 de ratón). Por consiguiente, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de MHC I quimérico puede estar operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder de MHC I no humana.

15 Un polipéptido de MHC I quimérico humano/no humano comprende en su porción humana un dominio extracelular completo o sustancialmente completo de un polipéptido de MHC I humano. Por consiguiente, la porción humana puede comprender al menos un 80 %, preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 90 %, por ejemplo, un 95 % o más de los aminoácidos que codifican un dominio extracelular de un polipéptido de MHC I humano (por ejemplo el polipéptido HLA-2A, el polipéptido HLA-B27). En un ejemplo, el dominio extracelular sustancialmente completo del polipéptido de MHC I humano carece de una secuencia líder de MHC I humana. En otro ejemplo, el polipéptido de MHC I quimérico humano/no humano comprende una secuencia líder de MHC I humano.

20 Por otra parte, el polipéptido de MHC I quimérico puede expresarse bajo el control de elementos reguladores no humanos endógenos, por ejemplo, elementos reguladores de MHC I de roedor. Tal disposición facilitará la expresión adecuada del polipéptido de MHC I quimérico en el animal no humano, por ejemplo, durante la respuesta inmunitaria en el animal no humano.

25 El roedor genéticamente modificado puede ser un ratón o una rata. Para los animales no humanos cuyas células ES genéticamente modificables adecuadas no estén fácilmente disponibles, se emplean otros métodos para obtener un animal no humano que comprenda la modificación genética. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, modificar el genoma de una célula no ES (por ejemplo, un fibroblasto o una célula pluripotente inducida) y emplear la transferencia nuclear para transferir el genoma modificado a una célula adecuada, por ejemplo, un oocito, y gestar la célula modificada (por ejemplo, el oocito modificado) en un animal no humano en las condiciones adecuadas para formar un embrión.

30 El animal genéticamente modificado es un roedor. En una realización, el roedor se selecciona entre un roedor y una rata. En un ejemplo, el roedor se selecciona de la superfamilia Muroidea. En un ejemplo, el animal genéticamente modificado es de una familia seleccionada entre Calomyscidae (por ejemplo, hámsteres similares a ratones), Cricetidae (por ejemplo, hámster, ratas y ratones del nuevo mundo, campañoles), Muridae (ratones y ratas auténticos, jerbos, ratones espinosos, ratas con cresta), Nesomyidae (ratones trepadores, ratones de abazón de las rocas, ratas coliblanco, ratas y ratones de Madagascar), Platanthomyidae (por ejemplo, lirón espinoso), y Spalacidae (por ejemplo, ratas topo, ratones del bambú, y zokores). En un ejemplo específico, el roedor genéticamente modificado se selecciona entre un ratón o rata auténtico (familia Muridae), un jerbo, un ratón espinoso, y una rata con cresta. En una realización, el ratón genéticamente modificado es un miembro de la familia Muridae. En una realización, el animal es un roedor. En una realización específica, el roedor se selecciona entre un ratón y una rata. En una realización, el animal no humano es un ratón.

35 En una realización específica, el animal no humano es un roedor que es un ratón de una cepa C57BL seleccionada entre C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr y C57BL/Ola. En otra realización, el ratón es una cepa 129 seleccionada entre el grupo que consiste en una cepa que es 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (por ejemplo, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (véase, por ejemplo, Festing et al. (1999) Revised nomenclature for strain 129 mice, Mammalian Genome 10:836, véase también, Auerbach et al (2000) Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines). En una realización específica, el ratón genéticamente modificado es una mezcla de una cepa 129 anteriormente mencionada y una cepa C57BL/6 anteriormente mencionada. En otra realización específica, el ratón es una mezcla de las cepas 129 anteriormente mencionadas, o una mezcla de las cepas BL/6 anteriormente mencionadas. En una realización específica, la cepa 129 de la mezcla es una cepa 129S6 (129/SvEvTac). En otra realización, el ratón es una cepa BALB, por ejemplo, cepa BALB/c. En otra realización más, el ratón es una mezcla de una cepa BALB y otra cepa anteriormente mencionada.

40 En una realización, el animal no humano es una rata. En una realización, la rata se selecciona entre una rata Wistar, una cepa LEA, una cepa Sprague Dawley, una cepa Fischer, F344, F6 y Dark Agouti. En una realización, la cepa de la rata es una mezcla de dos o más cepas seleccionadas entre el grupo que consiste en Wistar, LEA, Sprague Dawley,

Fischer, F344, F6 y Dark Agouti.

- Por consiguiente, en una realización, la invención se refiere a un ratón genéticamente modificado que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón, en donde una porción humana del polipéptido quimérico comprende un dominio de unión a péptidos o un dominio extracelular (por ejemplo, un dominio de unión a péptidos o extracelular funcional) de un HLA-B27 humano. En algunas realizaciones, el ratón no expresa un dominio de unión a péptidos o extracelular de un polipéptido de ratón endógeno a partir de su locus de ratón endógeno. El dominio de unión a péptidos del MHC I humano puede comprender dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Como alternativa, el dominio de unión a péptidos del MHC I humano puede comprender dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$. En un aspecto, el dominio extracelular del MHC I humano comprende un dominio extracelular de una cadena α de MHC I humano. El locus de ratón endógeno es un locus H-2D (por ejemplo, H-2D1), y la porción de ratón del polipéptido quimérico comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido H-2D de ratón (por ejemplo, H-2D1).
- En un ejemplo, se divulga un ratón genéticamente modificado, en donde el ratón comprende en su locus H-2K (por ejemplo, H-2Kb) endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón, en donde una porción humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido HLA-A2 humano (por ejemplo, HLA-A2.1) y una porción de ratón comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido H-2K de ratón (por ejemplo, H-2Kb). En un aspecto, el ratón no expresa un dominio extracelular, por ejemplo, un dominio extracelular funcional, del polipéptido H-2K de ratón (por ejemplo, H-2Kb) a partir de un locus MHC I endógeno. En un ejemplo, el ratón expresa un polipéptido quimérico HLA-A2/H-2K (por ejemplo, un polipéptido quimérico HLA-A2.1/H-2Kb) a partir de un locus H-2K endógeno (por ejemplo, H-2Kb). En diversas realizaciones, la expresión del gen quimérico está bajo el control de los elementos reguladores de MHC de clase I endógenos de ratón. En algunos aspectos, el ratón comprende dos copias del locus de MHC I quimérico que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico HLA-A2/H-2K; mientras que en otros aspectos, el ratón comprende una copia del locus de MHC I quimérico que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico HLA-A2/H-2K. Por consiguiente, el ratón puede ser homocigoto o heterocigoto para la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido quimérico HLA-A2/H-2K.
- En algunos ejemplos descritos en el presente documento, se proporciona un ratón que comprende un locus quimérico de MHC I ubicado en un locus H-2K de ratón endógeno. El locus quimérico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de una proteína HLA-A2 humana, por ejemplo, dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un gen HLA-A2 humano. El locus quimérico carece de una secuencia de nucleótidos que codifique un dominio extracelular de una proteína H-2K de ratón (por ejemplo, dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del H-2K de ratón). En un aspecto, el locus quimérico carece de una secuencia de nucleótidos que codifique un péptido líder, dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del H-2K de ratón; y comprende un péptido líder, dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un HLA-A2 humano y dominios transmembrana y citoplasmáticos de un H-2K de ratón. Los diversos dominios del locus quimérico están operativamente unidos entre sí de manera que el locus quimérico expresa una proteína MHC I quimérica humana/de ratón funcional.
- En una realización, se proporciona un ratón genéticamente modificado, en donde el ratón comprende en su locus H-2D (por ejemplo, H-2D1) endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón, en donde una porción humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido HLA-B27 humano y una porción de ratón comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido H-2D de ratón (por ejemplo, H-2D1). En un aspecto, el ratón no expresa un dominio extracelular, por ejemplo, un dominio extracelular funcional, del polipéptido H-2D de ratón a partir de un locus MHC I endógeno. En una realización, el ratón expresa un polipéptido quimérico HLA-B27/H-2D a partir de un locus H-2D endógeno. En diversas realizaciones, la expresión del gen quimérico está bajo el control de los elementos reguladores de MHC de clase I endógenos de ratón. En algunos aspectos, el ratón comprende dos copias del locus de MHC I quimérico que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico HLA-B27/H-2D; mientras que en otros aspectos, el ratón comprende una copia del locus de MHC I quimérico que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico HLA-B27/H-2D. Por consiguiente, el ratón puede ser homocigoto o heterocigoto para la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido quimérico HLA-B27/H-2D.
- En algunas realizaciones descritas en el presente documento, se proporciona un ratón que comprende un locus quimérico de MHC I ubicado en un locus H-2D de ratón endógeno. El locus quimérico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de una proteína HLA-B27 humana, por ejemplo, dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un gen HLA-B27 humano. El locus quimérico carece de una secuencia de nucleótidos que codifique un dominio extracelular de una proteína H-2D de ratón (por ejemplo, dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del H-2D de ratón). En un aspecto, el locus quimérico carece de una secuencia de nucleótidos que codifique dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$, y $\alpha 3$ de un H-2D de ratón; y comprende los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un HLA-B27 humano, y una secuencia líder y dominios transmembrana y citoplasmáticos de un H-2D de ratón. Los diversos dominios del locus quimérico están operativamente unidos entre sí de manera que el locus quimérico expresa una proteína MHC I quimérica humana/de ratón funcional.
- En diversas realizaciones, un roedor (por ejemplo, un ratón o una rata), que expresa una proteína MHC I quimérica funcional de un locus MHC I quimérico como se describe en el presente documento, presenta la proteína quimérica en una superficie celular. En una realización, el roedor expresa la proteína MHC I quimérica en una superficie celular

en una distribución celular que es la misma que la observada en un ser humano. En un aspecto, la célula presenta un fragmento de péptido (un fragmento de antígeno) unido a una porción extracelular (por ejemplo, porción extracelular de HLA-A2 o HLA-B27 humanos) de la proteína MHC I quimérica. En una realización, la porción extracelular de dicha proteína quimérica interactúa con otras proteínas en la superficie de dicha célula, por ejemplo, β 2-microglobulina.

5 En diversas realizaciones, una célula que presenta la proteína MHC I quimérica, por ejemplo, la proteína HLA-A2/H-2K o la proteína HL-B27/H-2D, es una célula nucleada. En diversos aspectos, la célula es una célula presentadora de antígenos (APC por sus siglas en inglés). Aunque la mayoría de las células del cuerpo pueden presentar un antígeno en el contexto de MHC I, algunos ejemplos no limitantes de células presentadoras de antígenos incluyen macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. Otras células presentadoras de antígenos, que incluyen APC profesionales o no profesionales, son conocidas en la técnica o se abarcan en el presente documento. En algunas realizaciones, la célula que presenta la proteína MHC I quimérica es una célula tumoral, y un fragmento peptídico presentado por la proteína quimérica deriva de un tumor. En otras realizaciones, el fragmento peptídico presentado por la proteína MHC I quimérica deriva de un patógeno, por ejemplo, una bacteria o un virus.

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

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

40 En diversos aspectos, la proteína quimérica (por ejemplo, la proteína HLA-A2/H-2K o HLA-B27/H-2D) también interactúa con las proteínas en la superficie de una segunda célula (a través de su porción extracelular). La segunda célula puede ser una célula de un origen no humano, por ejemplo, de un ratón o humano. La segunda célula puede derivar del mismo animal no humano o de la misma especie animal no humana que la célula que expresa el polipéptido de MHC I quimérico. Ejemplos no limitantes de proteínas con las que la porción extracelular de una proteína quimérica (por ejemplo, HLA-A2/H-2K o HLA-B27/H-2D) puede interactuar incluyen el receptor de linfocitos T (TCR) y su correceptor CD8. Por consiguiente, una segunda célula puede ser un linfocito T. Además, la porción extracelular de la proteína MHC I quimérica puede unirse a una proteína en la superficie de los linfocitos citolíticos naturales (NK por sus siglas en inglés), por ejemplo, los receptores tipo inmunoglobulina de los linfocitos NK (KIR) en la superficie de los linfocitos NK.

50 Un linfocito T o linfocito NK puede unirse a un complejo formado entre el polipéptido de MHC I quimérico y su fragmento peptídico presentado. Dicha unión puede dar como resultado la activación de linfocitos T o la inhibición de la muerte celular mediada por NK, respectivamente. Una hipótesis es que los linfocitos NK han evolucionado para destruir células infectadas o tumorales que han evadido la citotoxicidad mediada por linfocitos T al regular negativamente su complejo MHC I. Sin embargo, cuando el complejo MHC I se expresa en la superficie celular, los receptores de linfocitos NK lo reconocen y se inhibe la destrucción celular mediada por NK. Por consiguiente, en algunos aspectos, cuando un linfocito NK se une a un complejo formado entre el polipéptido de MHC I quimérico (por ejemplo, el polipéptido HLA-A2/H-2K o HLA-B27/H-2D) y un fragmento peptídico presentado en la superficie de la célula infectada o tumoral, se inhibe la destrucción celular mediada por NK.

60 En un ejemplo, el polipéptido de MHC I quimérico descritos en el presente documento, por ejemplo, un polipéptido quimérico HLA-A2/H-2K o HL-B27/H-2D, interactúa con la proteína CD8 en la superficie de una segunda célula. En una realización, la polipéptido de MHC I quimérico, por ejemplo, el polipéptido HLA-A2/H-2K o HL-B27/H-2D, interactúa con la proteína CD8 de roedor (por ejemplo, de ratón o de rata) endógena en la superficie de una segunda célula. En una realización, la segunda célula es un linfocito T. En otra realización, la segunda célula está modificada por ingeniería para expresar CD8. En determinados aspectos, la polipéptido de MHC I quimérico, por ejemplo, el polipéptido HLA-

A2/H-2K o HL-B27/H-2D, interactúa con un CD8 humano en la superficie de la segunda célula (por ejemplo, una célula humana o una célula de roedor). En algunas de dichas realizaciones, el roedor, por ejemplo, un ratón o una rata, comprende un transgén de CD8 humano, y el ratón o la rata expresa una proteína CD8 humana funcional.

5 El polipéptido de MHC I quimérico descrito en el presente documento también puede interactuar con un TCR no humano (por ejemplo, un ratón o una rata), con un TCR humano o con un TCR humanizado en una segunda célula. El polipéptido de MHC I quimérico puede interactuar con un TCR endógeno (por ejemplo, TCR de ratón o de rata) en la superficie de una segunda célula. El polipéptido de MHC I quimérico también puede interactuar con un TCR humano o humanizado en la superficie de una segunda célula, en donde la célula deriva del mismo animal o especie animal
10 (por ejemplo, ratón o rata) que la célula que expresa el polipéptido de MHC I quimérico. El polipéptido de MHC I quimérico también puede interactuar con un TCR humano expresado en la superficie de una célula humana.

También se divulga un embrión no humano (por ejemplo, un embrión de roedor, por ejemplo, un embrión de ratón o de rata), en donde el embrión comprende una célula ES donante que deriva de un animal no humano (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata) como se describe en el presente documento. En un aspecto, el embrión comprende una célula donante ES que comprende el gen MHC I quimérico y las células embrionarias del hospedador.

En el presente documento también se describe un tejido, en donde el tejido deriva de un animal no humano (por ejemplo, un ratón o una rata) como se describe en el presente documento, y expresa el polipéptido de MHC I quimérico
20 (por ejemplo, el polipéptido HLA-A2/H-2K o el polipéptido HLA-B27/H-2D).

Además, se divulga una célula no humana aislada de un animal no humano como se describe en el presente documento. En un ejemplo, la célula es una célula ES. En un ejemplo, la célula es una célula presentadora de antígenos, por ejemplo, célula dendrítica, macrófago, linfocito B. En un ejemplo, la célula es una célula inmunitaria. En un ejemplo, la célula inmunitaria es un linfocito.

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

En el presente documento se divulga una célula pluripotente inducida no humana que comprende un gen que codifica un polipéptido de MHC I quimérico (por ejemplo, el polipéptido HLA-A2/H-2K o HLA-B27/H-2D) como se describe en el presente documento. En un ejemplo, la célula pluripotente inducida deriva de un animal no humano como se describe en el presente documento.

En un aspecto, se divulga un hibridoma o cuadroma, derivado de una célula de un animal no humano como se describe en el presente documento. En un ejemplo, el animal no humano es un ratón o rata.

40 También se proporciona un método para producir un ratón modificado por ingeniería genética descritos en el presente documento. El método para producir un animal no humano modificado por ingeniería genética da como resultado el animal cuyo genoma comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I quimérico. El método da como resultado un ratón modificado por ingeniería genética, cuyo genoma comprende en un locus H-2D endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano /de ratón, en donde
45 una porción humana del polipéptido de MHC I quimérico comprende un dominio extracelular de un HLA-B27 humano y una porción de ratón comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos de un H-2D de ratón, respectivamente. En algunas realizaciones, el método utiliza una construcción de direccionamiento preparada utilizando la tecnología VELOCIGENE®, introduciendo la construcción en las células ES, e introduciendo los clones de células ES dirigidas en un embrión de ratón utilizando la tecnología VELOCIMOUSE®, tal como se describe en los Ejemplos. En una
50 realización, las células ES son una mezcla de cepas 129 y C57BL/6 de ratón; en otra realización, las células ES son una mezcla de cepas BALB/c y 129 de ratón.

Por consiguiente, también se proporciona una construcción de nucleótidos utilizada para generar animales no humanos modificado por ingeniería genéticas descritos en el presente documento. En un aspecto, la construcción de nucleótidos comprende: brazos de homología 5' y 3' no humanos, un fragmento de ADN humano que comprende secuencias de los genes HLA-A o HLA-B humanos y un casete de selección flanqueado por sitios de recombinación. En una realización, el fragmento de ADN humano es un fragmento genómico que comprende tanto intrones como exones de un gen HLA-B27 humano. En una realización, los brazos de homología no humanos son homólogos a un locus de MHC de clase I no humano (por ejemplo, locus H-2K o H-2D de ratón).

60 En un ejemplo, el fragmento genómico comprende una secuencia codificante de líder de HLA-A humano (por ejemplo, HLA-A2), un dominio $\alpha 1$, un dominio $\alpha 2$ y un dominio $\alpha 3$. En un ejemplo, el fragmento de ADN humano comprende, de 5' a 3': una secuencia líder de HLA-A, una líder/intrón $\alpha 1$ de HLA-A, un exón $\alpha 1$ de HLA-A, un intrón $\alpha 1$ - $\alpha 2$ de HLA-A, un exón $\alpha 2$ de HLA-A, un intrón $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de HLA-A y un exón $\alpha 3$ de HLA-A.

65 El fragmento genómico comprende una secuencia codificante del dominio $\alpha 1$, dominio $\alpha 2$ y dominio $\alpha 3$ de HLA-B27

humano. Por consiguiente, la secuencia de nucleótidos para generar animales modificados por ingeniería genética también puede comprender una secuencia líder no humana, por ejemplo, una de ratón, por ejemplo, una de H-2D de ratón. En una realización, el fragmento de ADN humano comprende, de 5' a 3': un exón $\alpha 1$ de HLA-B27 humano, un intrón $\alpha 1$ - $\alpha 2$ de HLA-B27, un exón $\alpha 2$ de HLA-B27, un intrón $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de HLA-B27 y un exón $\alpha 3$ de HLA-B27.

5 Un casete de selección es una secuencia de nucleótidos insertada en una construcción de direccionamiento para facilitar la selección de células (por ejemplo, células ES) que han integrado la construcción de interés. Un número de casetes de selección adecuados son conocidos en la técnica. De manera habitual, un casete de selección permite la selección positiva en presencia de un antibiótico concreto (por ejemplo, Neo, Hyg, Pur, CM, Spec, etc.). Además, un casete de selección puede estar flanqueado por sitios de recombinación, que permiten la selección del casete de selección tras el tratamiento con enzimas recombinasa. Los sitios de recombinación comúnmente utilizados son *loxP* y *Frt*, reconocidos por las enzimas Cre y Flp, respectivamente, pero se conocen otros en la técnica.

15 En una realización, el casete de selección se encuentra en el extremo 5' del fragmento de ADN humano. En otra realización, el casete de selección se encuentra en el extremo 3' del fragmento de ADN humano. En otra realización, el casete de selección se encuentra dentro del fragmento de ADN humano. En otra realización, el casete de selección se encuentra dentro de un intrón del fragmento de ADN humano. En otra realización, el casete de selección se encuentra dentro del intrón $\alpha 2$ - $\alpha 3$. En otra realización más, el casete de selección puede ubicarse dentro de la secuencia de ratón que es parte de la secuencia a insertar en el genoma del ratón.

20 En una realización, los brazos de homología no humanos 5' y 3' comprenden secuencia genómica en ubicaciones 5' y 3' de un locus génico de MHC de clase I no humano endógeno (p. ej., murino), respectivamente (p. ej., 5' de la primera secuencia líder y 3' del exón $\alpha 3$ del gen MHC I no humano). En otra realización, el brazo de homología no humano 5' puede comprender la secuencia genómica cadena arriba del exón $\alpha 1$ del gen MHC I no humano, por ejemplo, la secuencia genómica que comprende el exón de la secuencia líder no humana; en esta realización, la proteína MHC I quimérica humana/de ratón conserva la secuencia líder no humana. En una realización, el locus de MHC de clase I endógeno se selecciona entre H-2K, H-2D y H-2L de ratón.

30 En un ejemplo específico, el locus del MHC de clase I endógeno es H-2K de ratón. Por consiguiente, en un ejemplo, se proporciona una construcción de nucleótidos, que comprende, de 5' a 3': un brazo de homología 5' que contiene la secuencia genómica de ratón 5' del locus H-2K de ratón endógeno, un primer fragmento de ADN humano que comprende una primera secuencia genómica de un gen HLA-A, un sitio de secuencia de recombinación 5' (por ejemplo, *loxP*), un casete de selección, un sitio de secuencia de recombinación 3' (por ejemplo, *loxP*), un segundo fragmento de ADN humano que comprende una segunda secuencia genómica de un gen HLA-A y un brazo de homología 3' que contiene la secuencia genómica de ratón 3' de un exón $\alpha 3$ de H-2K endógeno. En un ejemplo, la construcción de nucleótidos comprende, de 5' a 3': un brazo de homología 5' que contiene la secuencia genómica de ratón 5' del locus H-2K de ratón endógeno, una secuencia genómica humana que incluye una secuencia líder de HLA-A, una secuencia líder/intrón $\alpha 1$ de HLA-A, un exón $\alpha 1$ de HLA-A, un intrón $\alpha 1$ - $\alpha 2$ de HLA-A, un exón $\alpha 2$ de HLA-A, una primera porción 5' de un intrón $\alpha 2$ - $\alpha 3$, un casete de selección flanqueado por sitios de recombinación, una segunda porción 3' de un intrón $\alpha 2$ - $\alpha 3$, un exón $\alpha 3$ de HLA-A y un brazo de homología 3' que contiene la secuencia genómica no de ratón 3' del exón $\alpha 3$ de H-2K de ratón endógeno. En una realización, una secuencia de brazo de homología 5' se expone en la SEQ ID NO: 1, y una secuencia de brazo de homología 3' se expone en la SEQ ID NO: 2.

45 En una realización específica, el locus de MHC de clase I endógeno es locus H-2D de ratón. Por consiguiente, en un aspecto, se proporciona una construcción de nucleótidos, que comprende, de 5' a 3': un brazo de homología 5' que contiene la secuencia genómica de ratón 5' del gen H-2D1 de ratón endógeno, un fragmento de ADN humano que comprende una secuencia genómica de un gen HLA-B27 y un brazo de homología 3' que contiene la secuencia genómica de ratón 3' de un gen H-2D endógeno. En una realización, la construcción de nucleótidos comprende, de 5' a 3': un brazo de homología 5' que contiene la secuencia genómica de ratón 5' del gen H-2D de ratón endógeno que incluye el exón de la secuencia líder y el líder-intrón $\alpha 1$ de H-2D1, un exón $\alpha 1$ de HLA-B27, un intrón $\alpha 1$ - $\alpha 2$ de HLA-B27, un exón $\alpha 2$ de HLA-B27, un intrón $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de HLA-B27 con un sitio de inserción 5' *loxP*, un exón $\alpha 3$ de HLA-B27, un intrón de dominio transmembrana $\alpha 3$ de H-2D de ratón, una secuencia genómica de dominio transmembrana y citoplasmático de ratón y una cola de poliA, un sitio 5' FTR, un casete de higromicina, un sitio 3' FTR, un sitio 3' *loxP* y un brazo de homología 3' que contiene la secuencia genómica cadena abajo del gen H-2D de ratón. En una realización, una secuencia del brazo de homología 5' abarca la secuencia genómica de ratón de 49,8 kb cadena arriba del gen H-2D de ratón endógeno e incluye la secuencia líder de H-2D, y un brazo de homología 3' abarca la secuencia genómica de ratón de 155,6 kb cadena abajo del gen H-2D de ratón endógeno.

60 Tras completar el direccionamiento del gen, las células ES o los animales no humanos modificados genéticamente se exploran para confirmar la incorporación correcta de la secuencia de nucleótidos exógena de interés o la expresión del polipéptido exógeno. Los expertos en la materia conocen numerosas técnicas que incluyen (aunque no de forma limitativa) transferencia Southern, PCR larga, PCT cuantitativa (por ejemplo, la PCR en tiempo real usando TAQMAN®), hibridación *in situ* fluorescente, transferencia Northern, citometría de flujo, análisis por transferencia Western, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, etc. En un ejemplo, los animales no humanos (por ejemplo, ratones) que portan la modificación genética de interés pueden identificarse mediante exploración para la pérdida de alelos del ratón y/o la ganancia de alelos humanos utilizando una modificación del ensayo de alelos descrito en Valenzuela et

al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, *Nature Biotech.* 21(6):652-659. Los expertos en la materia conocen otros ensayos que identifican una secuencia de nucleótidos o aminoácidos específica en los animales modificados genéticamente.

5 La divulgación también proporciona un método de acuerdo con la reivindicación 13. En algunos aspectos, una secuencia de nucleótidos de un dominio extracelular de un MHC I de ratón se reemplaza por una secuencia de nucleótidos de un dominio extracelular de un MHC I humano. El ratón puede no expresar la unión peptídica o el dominio extracelular del MHC I de ratón a partir de un locus de MHC I endógeno. En un ejemplo, una secuencia de nucleótidos de un dominio extracelular de H-2K de ratón se reemplaza por una secuencia de nucleótidos de un dominio extracelular de un HLA-A2 humano, de modo que el locus de MHC I de ratón modificado expresa un polipéptido quimérico HLA-A2/H-2K. En una realización, una secuencia de nucleótidos de un dominio extracelular de H-2D de ratón se reemplaza por una secuencia de nucleótidos de un dominio extracelular de un HLA-B27 humano, de modo que el locus de MHC I de ratón modificado expresa un polipéptido quimérico HLA-B27/H-2D.

15 En un aspecto, se divulga un método para producir una molécula quimérica de HLA de clase I humano/ MHC de clase I no humano, que comprende expresar en una sola célula una proteína quimérica HLA-A/H-2K o HLA-B/H-2D a partir de una construcción de nucleótidos, en donde la construcción de nucleótidos comprende una secuencia de ADNc que codifica un dominio $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una proteína HLA-A o HLA-B, respectivamente, y un dominio transmembrana y citoplasmático de una proteína H-2K o H-2D no humana, por ejemplo, proteína H-2K o H-2D de ratón, respectivamente.

20 En un ejemplo, la construcción de nucleótidos es un vector vírico; en un ejemplo específico, el vector vírico es un vector lentivírico. En un ejemplo, la célula se selecciona de una CHO, COS, 293, HeLa, y una célula retiniana que expresa una secuencia de un ácido nucleico vírico (por ejemplo, célula PERC.6™).

25 En el presente documento se divulga una célula que expresa una proteína quimérica HLA Clase I humano/ MHC I no humano (por ejemplo, proteína HLA-A/H-2K o HLA-B/H-2D). En un ejemplo, la célula comprende un vector de expresión que comprende un gen quimérico de MHC de clase I, en donde el gen quimérico de MHC de clase I comprende una secuencia de un gen HLA-A o HLA-B humano fusionado en un enlace operativo con una secuencia de un gen H-2K o H-2D no humano, por ejemplo, el gen H-2K o H-2D de ratón, respectivamente. En un ejemplo, la secuencia del gen HLA-A o HLA-B humano comprende los exones que codifican los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una proteína HLA-A o HLA-B. En un ejemplo, la secuencia del gen H-2K o H-2D no humano comprende los exones que codifican los dominios transmembrana y citoplasmáticos de una proteína H-2K o H-2D, respectivamente. En un ejemplo, la célula se selecciona de CHO, COS, 293, HeLa, y una célula retiniana que expresa una secuencia de un ácido nucleico vírico (por ejemplo, célula PERC.6™).

35 También se divulga una molécula MHC de clase I quimérica producida por un animal no humano como se describe en el presente documento en donde la molécula MHC de clase I quimérica comprende dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de una proteína HLA-A o HLA-B humana y dominios transmembrana y citoplasmáticos de una proteína H-2K o H-2D no humana, por ejemplo, de ratón. El polipéptido HLA-A/H-2K quimérico divulgado en el presente documento puede detectarse mediante anticuerpos anti-HLA-A. Por consiguiente, una célula que presenta un polipéptido HLA-A/H-2K humano/no humano quimérico puede detectarse y/o seleccionarse usando un anticuerpo anti-HLA-A. En algunos casos, el polipéptido HLA-A2/H-2K quimérico descrito en el presente documento puede detectarse mediante un anticuerpo anti-HLA-A2. En otro ejemplo, el polipéptido HLA-A/H-2D quimérico descrito en el presente documento puede detectarse mediante anticuerpos anti-HLA-B; por ejemplo, el polipéptido HLA-B27/H-2D quimérico puede detectarse mediante anticuerpos anti-HLA-B27.

45 Aunque los siguientes Ejemplos describen un animal modificado por ingeniería genética cuyo genoma comprende un reemplazo de una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular del polipéptido H-2K o H-2D de ratón con la secuencia que codifica un dominio extracelular de un HLA-A2 humano en el locus H-2K de ratón endógeno o HLA-B27 humano en el locus H-2D endógeno, respectivamente, un experto en la materia entenderá que se puede usar una estrategia similar para reemplazar otros loci de MHC I de ratón (por ejemplo, H-2L) con sus correspondientes loci de HLA humanos (por ejemplo, HLA-C). Por consiguiente, se divulga también un animal no humano que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I humano/no humano quimérico en donde una porción humana del polipéptido deriva de otra proteína HLA de clase I.

55 También se proporciona el reemplazo en múltiples loci MHC I. Por consiguiente, en el presente documento también se proporciona un roedor, por ejemplo, un ratón, que comprende en un locus de MHC I endógeno dos o más, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis, secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de MHC I humanos o humanizados, por ejemplo, humano/de roedor quimérico, por ejemplo, polipéptidos MHC I humano/de ratón. En un caso, cada uno de los dos cromosomas hermanos 17 de ratón contiene un locus de MHC I que comprende genes H-2K, H-2L y H-2D; por lo tanto, en un aspecto, cada cromosoma hermano puede codificar hasta tres polipéptidos quiméricos humanos/de ratón en sus posiciones genómicas endógenas. Por lo tanto, en una realización, un roedor genéticamente modificado, por ejemplo, un ratón, puede comprender hasta seis secuencias de nucleótidos diferentes que codifican hasta seis polipéptidos de MHC I humanos o humanizados, por ejemplo, hasta seis polipéptidos de MHC I humanos/de roedor quiméricos, por ejemplo, humano/de ratón, en sus loci de MHC endógenos. En otro caso, cada uno de los dos cromosomas hermanos 17 de ratón contiene un locus de MHC I que comprende genes H-2K y H-2D; por lo tanto, en un aspecto, cada cromosoma hermano puede codificar hasta dos polipéptidos quiméricos humanos/de

ratón en sus posiciones genómicas endógenas; y un roedor genéticamente modificado, por ejemplo, un ratón, puede comprender hasta cuatro secuencias de nucleótidos diferentes que codifican hasta cuatro polipéptidos de MHC I humanos o humanizados.

- 5 En una realización, en el presente documento se proporciona un ratón que comprende en un locus de MHC I endógeno dos o más, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de MHC I humanos o humanizados; por ejemplo, polipéptidos de MHC I quimérico humano/de ratón, en donde una porción humana de los polipéptidos quiméricos comprende un dominio extracelular de un polipéptido de MHC I humano y en donde una porción de ratón del polipéptido quimérico comprende un dominio transmembrana y citoplasmático de un polipéptido de MHC I de ratón y en donde el ratón expresa dos o más, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o seis, polipéptidos de MHC I quimérico humano/de ratón. En una realización, el de MHC I de ratón se selecciona de H-2D, H-2K y H-2L. En una realización, el MHC humano se selecciona de HLA-A, HLA-B y HLA-C.

- 15 Por consiguiente, en el presente documento se proporciona un ratón que comprende en un locus de MHC I endógeno dos secuencias de nucleótidos que codifica unos polipéptidos de MHC I quimérico humano/de ratón, en donde las dos secuencias de nucleótidos codifican los polipéptidos quiméricos HLA-A2/H-2K y HLA-B27/H-2D, y en donde el ratón expresa los polipéptidos quiméricos HLA-A2 /H-2K y HLA-B27/H-2D. En una realización, las secuencias de nucleótidos que codifican HLA-A2/H-2K y HLA-B27/H-2D se ubican en los loci H-2K y H-2D endógenos, respectivamente. En un aspecto, el ratón no expresa ningún polipéptido de MHC I de ratón funcional endógeno. En otro aspecto, el ratón conserva una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I de ratón endógeno, por ejemplo, expresa un polipéptido de MHC de ratón funcional (por ejemplo, polipéptido H-2L).

- 25 Asimismo, se divulga en el presente documento un método para generar un animal no humano, por ejemplo, un ratón, que comprende reemplazos en múltiples loci de MHC endógenos, por ejemplo, un no humano, por ejemplo, un ratón, que comprende uno o más, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis secuencias de nucleótidos que codifican polipéptido(s) de MHC I quiméricos humano/no humano, por ejemplo, humano/de ratón. Debido a la estrecha vinculación de los diversos loci de MHC I en el cromosoma 17 de ratón, en algún ejemplo, los métodos comprenden reemplazos sucesivos en el locus. En un ejemplo, el método comprende reemplazar una secuencia de nucleótidos que codifica un primer polipéptido de MHC I de ratón con una secuencia de nucleótidos que codifica un primer polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón en una célula ES, generando un ratón que expresa el primer polipéptido de MHC I quimérico, generando una célula ES a partir de dicho ratón, reemplazando en dicha célula ES una secuencia de nucleótidos que codifica un segundo polipéptido de MHC I de ratón con una secuencia de nucleótidos que codifica un segundo polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón y generando un ratón que expresa dos polipéptidos de MHC I quimérico humanos/de ratón. Se puede generar un ratón que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un tercer polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón de manera similar, reemplazando una secuencia de nucleótidos que codifica un tercer polipéptido de MHC I de ratón con una secuencia de nucleótidos que codifica un tercer polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón, realizado en una célula ES que comprende dos genes MHC I quiméricos. Como alternativa, el método puede comprender reemplazar una secuencia de nucleótidos que codifica un primer polipéptido de MHC I de ratón con una secuencia de nucleótidos que codifica un primer polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón en una célula ES, seguido por el reemplazo en la misma célula ES una secuencia de nucleótidos que codifica un segundo polipéptido de MHC I de ratón con una secuencia de nucleótidos que codifica un segundo polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón y generando un ratón que expresa dos polipéptidos de MHC I quimérico humanos/de ratón; un ratón que comprende tres polipéptidos de MHC I quimérico humano/de ratón puede generarse en la misma célula ES. El ratón que comprende uno, dos o tres polipéptidos de MHC I quimérico generados por reemplazo sucesivo puede ser heterocigoto u homocigoto para las secuencias de MHC I quimérico. Se puede generar un ratón que comprende cuatro, cinco y seis polipéptidos de MHC I quimérico cruzando dos animales, que comprenden cada uno de ellos secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de MHC I quimérico, dando como resultado un animal que, en una realización, es heterocigoto para cada una de las secuencias de MHC I quimérico. Un experto en la materia entenderá que un ratón que comprende dos, tres, o cuatro polipéptidos de MHC I quimérico también pueden generarse mediante cruce en lugar de por reemplazo sucesivo; este animal puede ser heterocigoto para todas las secuencias de MHC I quimérico (por ejemplo, un ratón que comprende un gen quimérico diferente en cada uno de sus cromosomas hermanos será heterocigoto para los dos genes MHC, etc.).

55 **Animales con β 2 Microglobulina Genéticamente Modificados**

En el presente documento se divulgan roedores genéticamente modificados que comprenden en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de β 2 microglobulina humano o humanizado; por lo tanto, los roedores expresan un polipéptido de β 2 microglobulina humano o humanizado.

- 60 La β 2 microglobulina o la cadena ligera del complejo MHC de clase I (también abreviada " β 2M") es una proteína pequeña (12 kDa) no glicosilada, que funciona principalmente para estabilizar la cadena α de MHC I. El gen de β 2 microglobulina humana codifica una proteína de 119 aminoácidos, con 20 aminoácidos N-terminales que codifican una secuencia líder. La proteína madura comprende 99 aminoácidos. El gen contiene 4 exones, con el primer exón que contiene la región no traducida 5', la secuencia líder completa y los primeros dos aminoácidos del polipéptido maduro; el segundo exón que codifica la mayoría de la proteína madura; el tercer exón que codifica los últimos cuatro

aminoácidos de la proteína madura y un codón de parada; y el cuarto exón que contiene la región 3' no traducida. Gussow et al. (1987) The β 2-Microglobulin Gene. Primary Structure and Definition of the Transcriptional Unit, *J. Immunol.* 139:3131-38. La β 2 microglobulina se asocia de forma no covalente con el MHC I. La β 2 microglobulina no unida se encuentra en los fluidos corporales, tal como el plasma, y se transporta al riñón para su excreción. La disfunción renal provoca la acumulación de β 2 microglobulina, que puede ser patógena (por ejemplo, Amiloidosis Relacionada con la Diálisis); la proteína acumulada forma fibrillas filamentosas que se asemejan a las placas amiloides en las articulaciones y los tejidos conectivos.

Además de la Amiloidosis Relacionada con la Diálisis, la β 2 microglobulina está implicada en varios trastornos diferentes. Se detectaron niveles elevados de β 2 microglobulina en neoplasias linfocíticas, por ejemplo, linfoma no de Hodgkin y mieloma múltiple. Véase, por ejemplo, Shi et al. (2009) β 2 Microglobulin: Emerging as a Promising Cancer Therapeutic Target, *Drug Discovery Today* 14:25-30. Algunas otras neoplasias malignas con niveles elevados de β 2 microglobulina incluyen cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer renal, cánceres gastrointestinal y nasofaríngeo. Se ha sugerido que la sobreexpresión de la β 2 microglobulina tiene efectos promotores del crecimiento tumoral. *Id.* También se ha demostrado recientemente que la β 2 microglobulina impulsa la transición epitelial a mesenquimatoso, promoviendo metástasis de hueso y tejido blando en cánceres de mama, próstata, pulmón y renal. Jossion et al. (2011) β 2 microglobulin Induces Epithelial to Mesenchymal Transition and Confers Cancer Lethality and Bone Metastasis in Human Cancer Cells. *Cancer Res.* 71(7): 1-11. La β 2 microglobulina interactúa con un miembro no clásico de MHC I, la proteína de hemocromatosis (HFE) y con el receptor de transferrina, y modula la homeostasia del hierro. *Id.* La participación de la β 2 microglobulina en otros signos distintivos de neoplasia (autorrenovación, potenciación de la angiogénesis, resistencia al tratamiento) está ampliamente documentada en la técnica.

Se han indicado ratones deficientes en β 2 microglobulina. Véase, Koller et al. (1990) Normal development of mice deficient in β 2m, MHC class I proteins, and CD8+ T cells, *Science* 248:1227-1230. Como se indica en Koller et al., estos ratones parecían sanos, sin embargo, no se detectó la expresión de MHC de clase I. Adicionalmente, la mayoría de las poblaciones de linfocitos T parecían normales en algunos tejidos, mientras que en otros se observó una marcada disminución de los linfocitos T CD8+. Esta supuesta falta de expresión de MHC I no está de acuerdo con los resultados anteriores obtenidos por Allen et al. ((1986) β 2 microglobulin Is Not Required for Cell Surface Expression of the Murine Class I Histocompatibility Antigen H-2Db or of a Truncated H-2Db, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7447-7451). Allen et al. informaron que la β 2 microglobulina no era absolutamente necesaria para la expresión de la superficie celular de todos los complejos de MHC I, porque las células que carecían de β 2 microglobulina fueron capaces de expresar H-2D^b. Sin embargo, supuestamente, la función de H-2D^b en estas células estaba comprometida, y la conformación de H-2D^b era diferente de la proteína natural, lo que explica la incapacidad de Koller y sus colegas para detectar esta proteína utilizando anticuerpos contra H-2D^b natural. Sin embargo, según se informa, las células que carecen de β 2 microglobulina pueden presentar antígenos endógenos a los linfocitos T CD8+ (incluidos los linfocitos T CD8+ exógenos de ratones normales) y, según se informa, no se requiere β 2 microglobulina para desarrollar altos niveles de CTL CD8+ restringidos al MHC de clase I H-2^d en respuesta a la exposición del antígeno en ratones, aunque es necesario para mantener una respuesta inmunitaria eficaz. Quinn et al. (1997) Virus-Specific, CD8+ Major Histocompatibility Complex Class I-Restricted Cytotoxic T Lymphocytes in Lymphocytic Choriomeningitis Virus-Infected β 2-Microglobulin-Deficient Mice, *J. Virol.* 71:8392-8396. Es de notar que la capacidad de generar altos niveles de tales linfocitos T en ausencia de β 2 microglobulina está limitada, según se informa, a una respuesta restringida a al MHC de clase I H-2^d. Se ha informado que los ratones deficientes en β 2 microglobulina tienen una serie de características impresionantes, tal como, por ejemplo, una mayor susceptibilidad a algunas enfermedades parasitarias, una mayor susceptibilidad a las infecciones de hepatitis, una deficiencia en el metabolismo del hierro y un fenotipo reproductivo deteriorado. Cooper et al. (2007) An impaired breeding phenotype in mice with a genetic deletion of Beta-2 microglobulin and diminished MHC class I expression: Role in reproductive fitness, *Biol. Reprod.* 77:274-279.

Se han informado ratones que expresan β 2 microglobulina humana, así como moléculas HLA de clase I humanas (es decir, HLA-B7) en un transgén insertado aleatoriamente. Chamberlain et al. (1988) Tissue-specific and cell surface expression of human major histocompatibility complex class I heavy (HLA-B7) and light (β 2-microglobulin) chain genes in transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7690-7694. La expresión de HLA de clase I humano fue consistente con la de el de clase I endógeno con una disminución marcada en el hígado. *Id.* La expresión de la β 2 microglobulina humana también fue consistente con la β 2 microglobulina endógena, mientras que la expresión de la molécula HLA de clase I humana se incrementó de 10 a 17 veces en ratones dobles transgénicos. *Id.* Sin embargo, los autores no intentaron un reemplazo de un locus de β 2 microglobulina endógeno de ratón con un locus de β 2 microglobulina humana.

Por lo tanto, en el presente documento se divulga un animal no humano genéticamente modificado (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata) cuyo genoma comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de β 2 microglobulina humana o humanizada. En un aspecto, el animal no expresa una β 2 microglobulina no humana endógena a partir de un locus de β 2 microglobulina no humano endógeno. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido de β 2 microglobulina que es parcialmente humano y parcialmente de no humano, por ejemplo, contiene algunos aminoácidos que corresponden a humana y algunos aminoácidos que corresponden a β 2 microglobulina no humana. En un aspecto, el animal no humano no expresa un polipéptido de β 2 microglobulina no humana endógeno a partir de un locus endógeno no humano, y solo expresa el polipéptido de β 2 microglobulina humana o humanizada. En un ejemplo, el animal no humano no expresa un polipéptido de β 2

microglobulina no humana endógeno completo sino que solo expresa una porción de un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina endógeno no humano a partir de un locus de $\beta 2$ microglobulina endógeno. Por consiguiente, en diversas realizaciones, el roedor no expresa un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina no humano funcional a partir de un locus de $\beta 2$ microglobulina no humano endógeno. En un aspecto específico, la secuencia de nucleótidos que codifica la $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada se encuentra en un locus de $\beta 2$ microglobulina no humana endógeno. En un aspecto, el animal comprende dos copias del locus de $\beta 2$ microglobulina endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. En otro aspecto, el animal comprende una copia del locus de $\beta 2$ microglobulina que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. Por consiguiente, el animal puede ser homocigoto o heterocigoto para locus de $\beta 2$ microglobulina que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. La secuencia de nucleótidos de la $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada puede derivar de una colección de secuencias de $\beta 2$ microglobulina que se encuentran naturalmente en poblaciones humanas. En diversas realizaciones, el roedor modificado por ingeniería genética comprende en su línea germinal una secuencia de nucleótidos que codifica una $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. En una realización, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de $\beta 2$ microglobulina humana. En una realización, el polipéptido es capaz de unirse a una proteína MHC I.

La secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada puede comprender restos de ácidos nucleicos correspondientes a todo el gen de $\beta 2$ microglobulina humana. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos puede comprender restos de ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 21-119 de una proteína $\beta 2$ microglobulina humana (es decir, restos de aminoácidos correspondientes a la $\beta 2$ microglobulina humana madura). En una realización alternativa, la secuencia de nucleótidos puede comprender restos de ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 23-115 de una proteína $\beta 2$ microglobulina humana, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 23-119 de una proteína $\beta 2$ microglobulina humana. Las secuencias de los ácidos nucleicos y aminoácidos de la $\beta 2$ microglobulina humana se describen en Gussow et al., *supra*.

Por consiguiente, el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada puede comprender la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 23-115 de un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 23-119 de un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos expuesta en los aminoácidos 21-119 de un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana. Como alternativa, la $\beta 2$ microglobulina humana puede comprender los aminoácidos 1-119 de un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica la $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en el exón 2 al exón 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana. Como alternativa, la secuencia de nucleótidos comprende secuencias de nucleótidos expuestas en los exones 2, 3 y 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana. En esta realización, las secuencias de nucleótidos establecidas en los exones 2, 3 y 4 están operativamente unidas para permitir la transcripción y traducción normales del gen. Por consiguiente, en una realización, la secuencia humana comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente del exón 2 al exón 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana. En una realización específica, la secuencia humana comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente del exón 2 a aproximadamente 267 pb después del exón 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana. En una realización específica, la secuencia humana comprende aproximadamente 2,8 kb de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana.

Por consiguiente, el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en el exón 2 al exón 4 de una $\beta 2$ microglobulina humana, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos correspondiente del exón 2 al exón 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana. Como alternativa, el polipéptido puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende las secuencias de nucleótidos expuestas en los exones 2, 3 y 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana. En una realización específica, el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada está codificado por una secuencia de nucleótidos correspondiente del exón 2 a aproximadamente 267 pb después del exón 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana. En otra realización específica, el polipéptido humano o humanizado está codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende aproximadamente 2,8 kb de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana. Como el exón 4 del gen de la $\beta 2$ microglobulina contiene la región no traducida 5', el polipéptido humano o humanizado puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende los exones 2 y 3 del gen de la $\beta 2$ microglobulina.

Los expertos en la materia entenderán que, aunque las secuencias específicas de ácidos nucleicos y aminoácidos para generar animales modificado por ingeniería genéticas se describen en los presentes ejemplos, también se proporcionan las secuencias de una o más sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, o secuencias diferentes de las descritas en el presente documento debido a la degeneración del código genético.

Por lo tanto, se proporciona un roedor que expresa una secuencia de $\beta 2$ microglobulina humana, en donde la secuencia de $\beta 2$ microglobulina es al menos aproximadamente un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de $\beta 2$ microglobulina humana. En una realización específica, la secuencia de $\beta 2$ microglobulina es al

menos aproximadamente un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de $\beta 2$ microglobulina humana descrita en los Ejemplos. En una realización, la secuencia de $\beta 2$ microglobulina humana comprende una o más sustituciones conservativas. En una realización, la secuencia de $\beta 2$ microglobulina humana comprende una o más sustituciones no conservativas.

5 Además, se proporcionan roedores en donde la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada también comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en el exón 1 de un gen de $\beta 2$ microglobulina no humana. Por consiguiente, en una realización específica, el roedor comprende en su genoma una
 10 secuencia de nucleótidos que codifica una $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada en donde la secuencia de nucleótidos comprende el exón 1 de una $\beta 2$ microglobulina no humana y los exones 2, 3 y 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana. Por consiguiente, el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada está codificado por el exón 1 de un gen de $\beta 2$ microglobulina no humana y los exones 2, 3 y 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana (p. ej., exones 2 y 3 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana).

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

20 Por consiguiente, en algunos aspectos, se proporciona un ratón modificado por ingeniería genética, en donde el ratón comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada como se describe en el presente documento. Se proporciona un ratón modificado por ingeniería genética, en donde el ratón comprende en su locus endógeno de $\beta 2$ microglobulina una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada (por ejemplo, un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o
 25 sustancialmente humana). En algunas realizaciones, el ratón no expresa un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina endógeno (p. ej., un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina endógeno funcional) a partir de un locus de $\beta 2$ microglobulina endógeno. En algunas realizaciones, el ratón modificado por ingeniería genética comprende una secuencia de nucleótidos que comprende el exón 1 de un gen de $\beta 2$ microglobulina de ratón y los exones 2, 3 y 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana. En algunas realizaciones, el ratón expresa el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o
 30 humanizada.

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

35 En una realización, el locus modificado es un locus de roedor. En una realización específica, el locus de roedor se selecciona de un locus de ratón o de rata. En una realización, el locus de roedor se modifica con al menos una secuencia codificante de $\beta 2$ microglobulina humana.

40 En una realización, la secuencia de $\beta 2$ microglobulina heteróloga está operativamente unida a elementos reguladores endógenos, por ejemplo, secuencia de promotor y/o de control de expresión endógena. En una realización específica, la secuencia de $\beta 2$ microglobulina heteróloga es una secuencia humana y la secuencia humana está operativamente unida a una secuencia de promotor y/o de control de expresión endógena.

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

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

55 En el presente documento también se divulga un tejido o célula, en donde el tejido o célula deriva de un animal no humano como se describe en el presente documento, y comprende un gen de $\beta 2$ microglobulina heterólogo o una secuencia de $\beta 2$ microglobulina, es decir, la secuencia de nucleótidos o aminoácidos. En una realización, el gen de $\beta 2$ microglobulina heterólogo o la secuencia de $\beta 2$ microglobulina es un gen de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada o una secuencia de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. Preferentemente, la célula es una célula nucleada. La célula puede ser cualquier célula conocida por expresar el complejo MHC I, por ejemplo, una célula presentadora de antígenos. El polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada expresado por dicha célula puede interactuar con MHC I no humano endógeno (por ejemplo, MHC I de roedor), para formar un complejo MHC I funcional. El complejo MHC I resultante puede ser capaz de interactuar con un linfocito T, por ejemplo, un linfocito T citotóxico. Por consiguiente, también se divulga en el presente documento un complejo *in vitro* de una célula de un animal no humano como se describe en el presente documento y un linfocito T.

También se divulgan en el presente documento células no humanas que comprenden el gen o secuencia de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada, y una secuencia humana o humanizada adicional, por ejemplo, el polipéptido de MHC I quiméricos divulgado actualmente. En un caso de este tipo, el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada puede interactuar con, por ejemplo, un polipéptido de MHC I quimérico humano/no humano y se puede formar un complejo MHC I funcional. En algunos aspectos, dicho complejo es capaz de interactuar con un TCR en un linfocito T, por ejemplo, un linfocito T humano o uno no humano. Por consiguiente, también se divulga en el presente documento un complejo *in vitro* de una célula a partir de un animal no humano como se describe en el presente documento y un linfocito T humano o uno no humano.

Otro aspecto de la divulgación es un embrión de roedor (por ejemplo, un embrión de ratón o de rata) que comprende un gen de $\beta 2$ microglobulina heterólogo o una secuencia de $\beta 2$ microglobulina como se describe en el presente documento. En un ejemplo, el embrión comprende una célula donante ES que comprende el gen de $\beta 2$ microglobulina o la secuencia de $\beta 2$ microglobulina y células embrionarias hospedadoras. El gen de $\beta 2$ microglobulina heterólogo o la secuencia de $\beta 2$ microglobulina es un gen de $\beta 2$ microglobulina o una secuencia de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada.

En el presente documento se divulga una célula no humana que comprende un cromosoma o fragmento del mismo de un animal no humano como se describe en el presente documento (por ejemplo, en el que el cromosoma o fragmento del mismo comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada). La célula no humana puede comprender un núcleo de un animal no humano como se describe en el presente documento. En un ejemplo, la célula no humana comprende el cromosoma o fragmento del mismo como resultado de una transferencia nuclear.

En un aspecto, se divulga una célula pluripotente inducida no humana que comprende un gen de $\beta 2$ microglobulina heterólogo o una secuencia de $\beta 2$ microglobulina. En un ejemplo, la célula pluripotente inducida deriva de un animal no humano como se describe en el presente documento. En un ejemplo, el gen de $\beta 2$ microglobulina heterólogo o la secuencia de $\beta 2$ microglobulina es un gen o secuencia humanos o humanizados.

También se divulgados en el presente documento un hibridoma o cuadroma, derivado de una célula de un animal no humano como se describe en el presente documento. En un ejemplo, el animal no humano es un ratón o rata.

La divulgación también proporciona métodos para producir un ratón modificado por ingeniería genética descrito en el presente documento. Los métodos dan como resultado un ratón cuyo genoma comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. En un aspecto, los métodos dan como resultado un ratón modificado por ingeniería genética, cuyo genoma comprende en un locus de $\beta 2$ microglobulina endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. En algunos casos, el ratón no expresa una $\beta 2$ microglobulina de ratón funcional a partir de un locus de $\beta 2$ microglobulina de ratón endógeno. En algunos aspectos, los métodos utilizan una construcción de direccionamiento preparada utilizando la tecnología VELOCIGENE®, introduciendo la construcción en las células ES, e introduciendo los clones de células ES dirigidas en un embrión de ratón utilizando la tecnología VELOCIMOUSE®, tal como se describe en los Ejemplos. En una realización, las células ES son mezcla de cepas 129 y C57BL/6 de ratón; en otra realización, las células ES son una mezcla de cepas BALB/c y 129 de ratón.

También se proporciona una construcción de nucleótidos utilizada para generar animales no humanos modificado por ingeniería genética. La construcción de nucleótidos puede comprender: brazos de homología 5' y 3' no humanos, un fragmento de ADN humano que comprende secuencias de $\beta 2$ microglobulina humana y un casete de selección flanqueado por sitios de recombinación. En una realización, el fragmento de ADN humano es un fragmento genómico que comprende tanto intrones como exones de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana. En una realización, los brazos de homología no humanos son homólogos a un locus de $\beta 2$ microglobulina no humana. El fragmento genómico puede comprender los exones 2, 3 y 4 del gen de la $\beta 2$ microglobulina humana. En un caso, el fragmento genómico comprende, de 5' a 3': exón 2, intrón, exón 3, intrón y exón 4, todos de secuencia de $\beta 2$ microglobulina humana. El casete de selección puede ubicarse en cualquier lugar de la construcción fuera de la región codificante de $\beta 2$ microglobulina, por ejemplo, puede ubicarse 3' del exón 4 de la $\beta 2$ microglobulina humana. Los brazos de homología 5' y 3' no humanos pueden comprender la secuencia genómica 5' y 3' del gen de $\beta 2$ microglobulina no humana endógeno, respectivamente. En otra realización, los brazos de homología 5' y 3' no humanos comprenden la secuencia genómica 5' del exón 2 y 3' del exón 4 del gen no humano endógeno, respectivamente.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para modificar un locus de $\beta 2$ microglobulina de un ratón para expresar un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada descrito en el presente documento. Un método de modificación de un locus de $\beta 2$ microglobulina de un ratón para expresar un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada que comprende reemplazar en un locus de $\beta 2$ microglobulina endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica una $\beta 2$ microglobulina de ratón con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. En una realización de dicho método, el ratón no expresa un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina funcional a partir de un locus de $\beta 2$ microglobulina de ratón endógeno. En algunas realizaciones específicas, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada

comprende la secuencia de nucleótidos expuesta en los exones 2 a 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana. En otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada comprende secuencias de nucleótidos expuestas en los exones 2, 3 y 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana.

5 Animales con MHC I/ $\beta 2$ Microglobulina Genéticamente Modificados

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

Surgen diferencias funcionales en el uso de componentes de sistemas mixtos humanos/no humanos. HLA clase I se une a $\beta 2$ microglobulina más fuerte que la clase I de ratón. Bernabeu (1984) $\beta 2$ -microglobulin from serum associates with MHC class I antigens on the surface of cultured cells, Nature 308:642-645. Los intentos de anular las diferencias funcionales se reflejan en la construcción de ratones MHC humanizados particulares. Se han desarrollado ratones nuligénicos para H-2 de clase I y de clase 2 (en un fondo nuligénico de $\beta 2$ microglobulina de ratón) que expresan un transgén quimérico HLA-A2.1/HLA-DR1 humano integrado aleatoriamente que tiene $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de HLA-A2.1 humano, y $\alpha 3$ de ratón H-2Db, unidos en su extremo N a través de un enlazador al extremo C de la $\beta 2$ microglobulina humana. Véase, por ejemplo, Pajot et al. (2004) A mouse model of human adaptive immune functions: HLA-A2.1/HLA-DR1-transgenic H-2 class I/class II-knockout mice, Eur. J. Immunol. 34:3060-3069. Según se informa, estos ratones generan anticuerpos específicos de antígeno y respuestas de CTL contra el virus de la hepatitis B, mientras que los ratones simplemente transgénicos para ratones nuligénicos para HLA-A2.1 o H-2 clase I/clase II no lo hacen. La deficiencia de ratones que son simplemente transgénicos para los genes se debe probablemente a la capacidad de dichos ratones para emplear genes de clase I y/o de clase II endógenos para eludir cualquier transgén, una opción que no está disponible para ratones nuligénicos para MHC. Sin embargo, los ratones pueden expresar al menos H-2D^b, probablemente debido a las reproducciones con ratones con fondo nuligénico para $\beta 2$ microglobulina de ratón (véase, Pajot et al., *supra*; que aparentemente comprendían un locus de clase I y de clase II endógeno intacto).

Según se informa, la expresión en la superficie celular de la fusión quimérica con $\beta 2$ microglobulina humana es más baja que la expresión de MHC endógeno, pero no se informa la supervivencia/tasa de destrucción por NK, ni la tasa de autodestrucción por NK. Pajot et al., *supra*. Se observó una cierta mejora en el número de linfocitos T CD8+ en ratones nuligénicos para $\beta 2$ microglobulina deficientes en MHC clase I (2-3 % del total de esplenocitos, frente a 0,6-1 % en los ratones nuligénicos para $\beta 2$). Sin embargo, el uso de la región variable de los linfocitos T mostró perfiles alterados para los segmentos génicos BV 5.1, BV 5.2 y BV 11. Según se informa, las respuestas de los linfocitos T CD8+ y CD4+ se restringieron al antígeno de hepatitis B apropiado utilizado para inmunizar a los ratones, aunque al menos dos ratones destruyeron las células que portaban cualquiera de los antígenos, donde los ratones se inmunizaron con un solo antígeno, lo que podría deberse a falta de inhibición de linfocitos NK o falta de selectividad de linfocitos NK.

Como se ha mencionado anteriormente, los ratones transgénicos tanto para el MHC I humano como para la $\beta 2$ microglobulina humana comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína quimérica de MHC I/ $\beta 2$ microglobulina, en donde las porciones de MHC I y $\beta 2$ microglobulina están contenidas dentro de una única cadena polipeptídica, dando como resultado que la cadena α de MHC I y $\beta 2$ microglobulina estén covalentemente unidas entre sí y por lo tanto atadas a la superficie celular. Se proporciona un ratón que comprende en su genoma dos secuencias de nucleótidos independientes, una que codifica un polipéptido MHC I humano o humanizado y la otra que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. El ratón proporcionado en el presente documento expresaría un complejo MHC I que se asemeja más a un complejo MHC I presente en la naturaleza, en donde la cadena α de MHC I y la $\beta 2$ microglobulina se proporcionan en dos cadenas polipeptídicas separadas con la $\beta 2$ microglobulina que se asocia de forma no covalente con la cadena α de MHC I.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un ratón que comprende en su genoma: una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I humano o humanizado, y una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. En un aspecto, se proporciona un ratón que comprende en su genoma: (a) una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano /de ratón, en donde la porción humana del polipéptido quimérico comprende un dominio de unión a péptidos o un dominio extracelular de un HLA-B27 humano, y (b) una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada.

La primera secuencia de nucleótidos se ubica en un locus H-2D endógeno de manera que el ratón puede comprender en su genoma un reemplazo en el locus de MHC I de la totalidad o una porción del gen MHC I endógeno (por ejemplo, una porción que codifica un dominio de unión a péptidos o un dominio extracelular) con la secuencia de MHC I humano correspondiente. Por consiguiente, el ratón puede comprender en un locus H-2D endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de un HLA-B27 humano y dominios transmembrana y citoplasmáticos del endógeno. En un aspecto, el animal es un ratón, y la primera secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de un HLA-A2 humano (por ejemplo, HLA-A2.1) y dominios transmembrana y citoplasmáticos de H-2K de ratón (por ejemplo, H-2Kb). En otro aspecto, el animal es un ratón y la

primera secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular de un HLA-B27 humano y dominios transmembrana y citoplasmáticos de H-2D de ratón (por ejemplo, H-2D1).

La segunda secuencia de nucleótidos puede ubicarse en un locus de $\beta 2$ microglobulina no humana endógeno de modo que el animal comprenda en su genoma un reemplazo en el locus de $\beta 2$ microglobulina de la totalidad o una porción del gen de $\beta 2$ microglobulina endógeno con la secuencia de $\beta 2$ microglobulina humana correspondiente. La segunda secuencia de nucleótidos puede comprender una secuencia de nucleótidos expuesta en el exón 2 al exón 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana. Como alternativa, la segunda secuencia de nucleótidos puede comprender secuencias de nucleótidos expuestas en los exones 2, 3 y 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana. En esta realización, las secuencias de nucleótidos están operativamente unidas entre sí. La segunda secuencia de nucleótidos puede comprender además la secuencia del exón 1 de un gen de $\beta 2$ microglobulina no humana.

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

Preferentemente, la primera y la segunda secuencia de nucleótidos están operativamente unidas a elementos de control de expresión endógenos (p. ej., promotores, potenciadores, silenciadores, etc.).

Varias realizaciones diferentes de la primera y segunda secuencias de nucleótidos (y los polipéptidos que codifican) abarcadas en el presente documento pueden entenderse fácilmente a partir de las realizaciones descritas a lo largo de la memoria descriptiva, por ejemplo, las descritas en las secciones relacionadas con los roedores con MHC I modificadas por ingeniería genética y los roedores con $\beta 2$ microglobulina modificados por ingeniería genética.

En un aspecto, la divulgación proporciona un ratón que comprende en su genoma (a) una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de HLA-B27/H-2D quimérico humano/de ratón, en donde la porción humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de un HLA-B27 humano y la porción de ratón comprende dominios transmembrana y citoplasmáticos de un H-2D de ratón, respectivamente, y (b) una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada (por ejemplo, en donde la secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en el exón 2 al exón 4 del gen de $\beta 2$ microglobulina humana o secuencias de nucleótidos expuestas en el exón 2, 3 y 4 del gen de $\beta 2$ microglobulina humana), en donde la primera secuencia de nucleótidos se encuentra en un locus H-2D endógeno, y la segunda secuencia se encuentra en un locus de $\beta 2$ microglobulina endógeno. En una realización, el ratón no expresa los polipéptidos H-2K o H-2D y de $\beta 2$ microglobulina de ratón funcionales a partir de sus respectivos loci endógenos. En una realización, el ratón expresa el polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón y el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada.

Como se muestra en los siguientes ejemplos, los animales modificadas por ingeniería genética para coexpresar tanto el MHC I como la $\beta 2$ microglobulina humanos o humanizados presentaron una mayor expresión de MHC clase I quimérico en la superficie celular en comparación con los animales humanizados para MHC I solo. En algunas realizaciones, la coexpresión de MHC I y $\beta 2$ microglobulina humanos o humanizados aumenta la expresión en la superficie celular de MHC I humano o humanizado en más de aproximadamente un 10 %, por ejemplo, más de aproximadamente un 20 %, por ejemplo, aproximadamente un 50 % o más, por ejemplo, aproximadamente un 70 %, sobre la expresión de MHC I humano o humanizado en ausencia de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada.

La divulgación también proporciona un método para producir ratones modificados por ingeniería genética cuyo genoma comprende una primera y una segunda secuencia de nucleótidos como se describe en el presente documento. El método generalmente comprende generar un primer animal no humano modificado por ingeniería genética cuyo genoma comprende una primera secuencia de nucleótidos descrita en el presente documento (es decir, una secuencia de MHC I humano o humanizado), generando un segundo animal no humano modificado por ingeniería genética cuyo genoma comprende una segunda secuencia de nucleótidos descrita en el presente documento (es decir, una secuencia de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada), y cruzando el primer y el segundo animal para obtener una progenie cuyo genoma contiene ambas secuencias de nucleótidos. En un ejemplo, el primer y el segundo animal son heterocigotos para la primera y la segunda secuencia de nucleótidos, respectivamente. En un ejemplo, el primer y el segundo animal son homocigotos para la primera y la segunda secuencia de nucleótidos, respectivamente. En un ejemplo, el primer y segundo animal se generan mediante el reemplazo de loci no humanos endógenos con la primera y la segunda secuencia de nucleótidos, respectivamente. En un aspecto, el primer y el segundo animal se generan mediante la utilización de construcciones generadas a través de tecnología VELOCIGENE®, y la introducción de clones de células ES dirigidas que portan tales construcciones en un embrión (p. ej., un embrión de roedor, por

ejemplo, un embrión de ratón o de rata) a través del método VELOCIMOUSE®.

En otro aspecto más, la invención proporciona un roedor genéticamente modificado, por ejemplo, ratón o rata que comprende en su genoma secuencias de nucleótidos que codifican dos o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis) polipéptidos de MHC I quimérico humano/de roedor (p. ej., quiméricos humanos/de ratón) y una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. Varios aspectos de los polipéptidos de MHC I quimérico humano/no humanos y la $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada se divulgan a lo largo de la memoria descriptiva y quedarían claros a partir de la divulgación a los expertos en la materia. También se proporcionan, en el presente documento, métodos para generar roedores que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican dos o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis) polipéptidos de MHC I quimérico humano/de roedor (p. ej., quiméricos humanos/de ratón) y una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada.

Uso de Animales Genéticamente Modificados

En diversas realizaciones, los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento producen APC con MHC I y/o $\beta 2$ microglobulina humanos y humanizados en la superficie celular y, como resultado, presentar péptidos derivados de proteínas citosólicas como epítomos para CTL de forma tipo humana, ya que, sustancialmente, todos los componentes del complejo son humanos o humanizados. Los roedores modificados genéticamente de la invención se pueden usar para estudiar la función del sistema inmunitario humano en el animal humanizado; para la identificación de antígenos y epítomos de antígenos que desencadenan la respuesta inmunitaria (por ejemplo, epítomos de linfocitos T, por ejemplo, epítomos únicos de cáncer humano), por ejemplo, para su uso en el desarrollo de vacunas; para la identificación de linfocitos T de alta afinidad con patógenos humanos o antígenos cancerosos (es decir, linfocitos T que se unen a antígenos en el contexto del complejo MHC I humano con alta avidéz), por ejemplo, para su uso en terapia con linfocitos T adaptativa; para evaluar candidatos de vacunas y otras estrategias de vacunas; para estudiar la autoinmunidad humana; para estudiar las enfermedades infecciosas humanas; y de otra forma, para idear mejores estrategias terapéuticas basadas en la expresión del MHC humano.

El complejo MHC I une péptidos y los presenta sobre la superficie celular. Una vez presentados sobre la superficie en el contexto de dicho complejo, los péptidos son reconocibles por los linfocitos T. Por ejemplo, cuando el péptido deriva de un patógeno u otro antígeno de interés (p. ej., un antígeno tumoral), el reconocimiento de los linfocitos T puede dar como resultado la activación de los linfocitos T, la destrucción de las células que portan la secuencia peptídica presentada por los macrófagos y la activación por los linfocitos B de anticuerpos que se unen a la secuencia presentada.

Los linfocitos T interactúan con las células que expresan el complejo MHC I a través del ectodominio MHC de clase I unido a péptidos y el ectodominio CD8 de linfocitos T. Los linfocitos T CD8+ que encuentran APC que tienen antígenos adecuados unidos a la molécula MHC de clase I se convertirán en linfocitos T citotóxicos. Por consiguiente, los antígenos que en el contexto de MHC clase I se unen con alta avidéz a un receptor de linfocitos T son potencialmente importantes en el desarrollo de tratamientos para patologías humanas. Sin embargo, la presentación de antígenos en el contexto del MHC I de ratón es solo algo relevante para enfermedades humanas, ya que los complejos MHC humanos y de ratón reconocen los antígenos de manera diferente, por ejemplo, un MHC I de ratón puede no reconocer los mismos antígenos o puede presentar epítomos diferentes que un MHC I humano. Por consiguiente, los datos más relevantes para las patologías humanas se obtienen a través del estudio de la presentación de epítomos de antígenos por el MHC humano I.

Por consiguiente, en diversas realizaciones, los roedores modificados por ingeniería genética de la presente invención son útiles, entre otras cosas, para evaluar la capacidad de un antígeno para iniciar una respuesta inmunitaria en un ser humano, y para generar diversos antígenos e identificar un antígeno específico que puede usarse en el desarrollo de vacunas humanas.

En un aspecto, se divulga un método para determinar la antigenicidad en un ser humano de una secuencia peptídica, que comprende exponer un animal no humano genéticamente modificado como se describe en el presente documento a una molécula que comprende la secuencia peptídica, permitiendo que el animal no humano monte una respuesta inmunitaria, y detectando en el animal no humano una célula que se une a una secuencia del péptido presentada por un MHC I quimérico humano/no humano, o un complejo MHC I humanizado (que comprende un MHC I quimérico humano/no humano y una $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada) como se describe en el presente documento.

En un aspecto, se divulga un método para determinar si un péptido provocará una respuesta inmunitaria celular en un ser humano, que comprende exponer un animal no humano genéticamente modificado como se describe en el presente documento al péptido, permitiendo que el animal no humano monte una respuesta inmunitaria, y detectando en el animal no humano una célula que se une a una secuencia del péptido presentado por una molécula MHC I quimérica humana/no humana como se describe en el presente documento. En un ejemplo, el animal no humano después de la exposición comprende un linfocito T citotóxico CD8+ (CTL) restringido por MHC clase I que se une al péptido. En un ejemplo, el CTL destruye una célula que porte el péptido.

- 5 En un aspecto, se divulga un método para identificar un epítipo de CTL humano, que comprende exponer un animal no humano como se describe en el presente documento a un antígeno que comprende un supuesto epítipo de CTL, permitiendo que el animal no humano monte una respuesta inmunitaria, aislando del animal no humano un CTL CD8+ restringido por MHC de clase I que se une al epítipo e identificando el epítipo unido al CTL CD8+ restringido por MHC de clase I.
- 10 En un aspecto, se divulga un método para identificar un péptido restringido por HLA de clase I cuya presentación por una célula humana y unión por un linfocito humano (por ejemplo, linfocito T humano) dará como resultado la citotoxicidad de la célula portadora del péptido, que comprende exponer un animal no humano (o la célula que expresa MHC de clase I del mismo) como se describe en el presente documento a una molécula que comprende un péptido de interés, aislando una célula del animal no humano que expresa una molécula de clase I quimérica humana/no humana que se une al péptido de interés, exponiendo la célula a un linfocito humano que es capaz de llevar a cabo citotoxicidad restringida por HLA de clase I y medir la citotoxicidad inducida por el péptido.
- 15 En un aspecto, se divulga un método para identificar un antígeno que genera una respuesta de linfocitos T citotóxicos en un ser humano, que comprende exponer un supuesto antígeno a un ratón como se describe en el presente documento, permitiendo que el ratón genere una respuesta inmunitaria e identificando el antígeno unido por la molécula restringida por HLA de clase I.
- 20 En un ejemplo, el antígeno comprende una superficie o proteína de envoltura bacteriana o vírica. En un ejemplo, el antígeno comprende un antígeno sobre la superficie de una célula tumoral humana. En un ejemplo, el antígeno comprende una supuesta vacuna para su uso en un ser humano. En un ejemplo, el antígeno comprende un epítipo humano que genera anticuerpos en un ser humano. En otro ejemplo, el antígeno comprende un epítipo humano que genera CTL de alta afinidad que se dirigen al complejo epítipo/MHC I.
- 25 En un aspecto, se divulga un método para determinar si un supuesto antígeno contiene un epítipo que, tras la exposición a un sistema inmunitario humano generará una respuesta inmunitaria restringida por HLA de clase I, por ejemplo, respuesta inmunitaria restringida por HLA-A (por ejemplo, respuesta restringida por HLA-A2) o respuesta restringida por HLA-B (por ejemplo, respuesta restringida por HLA-B27), que comprende exponer un ratón como se describe en el presente documento al supuesto antígeno y medir una respuesta inmunitaria restringida por HLA específico de antígeno, por ejemplo, restringida por HLA-A o HLA-B (por ejemplo, restringida por HLA-A2 o restringida por HLA-B27) en el ratón.
- 30 En un ejemplo, el supuesto antígeno se selecciona de un agente biofarmacéutico o fragmento del mismo, una proteína no propia, un antígeno de superficie de una célula no propia, un antígeno de superficie de una célula tumoral, un antígeno de superficie de una célula bacteriana o de levadura o fúngica, un antígeno de superficie o proteína de envoltura de un virus.
- 35 Además, los animales no humanos modificadas por ingeniería genética descritos en el presente documento pueden ser útiles para la identificación de receptores de linfocitos T, por ejemplo, receptores de linfocitos T de alta avidéz, que reconocen un antígeno de interés, por ejemplo, un tumor u otro antígeno de enfermedad. El método puede comprender: exponer el animal no humano descrito en el presente documento a un antígeno, permitir que el animal no humano monte una respuesta inmunitaria al antígeno, aislar del animal no humano un linfocito T que comprende un receptor de linfocitos T que se une al antígeno presentado por un MCH I humano o humanizado y determinar la secuencia de dicho receptor de linfocitos T.
- 40 En un aspecto, se divulga un método para identificar un dominio variable del receptor de linfocito T que tiene alta afinidad por un antígeno tumoral humano, que comprende exponer un ratón que comprende dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de MHC I humanizado (por ejemplo, dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de HLA-A2 o HLA-B27) a un antígeno tumoral humano; permitiendo que el ratón genere una respuesta inmunitaria; y, aislar del ratón una secuencia del ácido nucleico que codifica un dominio variable del receptor de linfocitos T, en donde el dominio variable del receptor de linfocitos T une el antígeno tumoral humano con una K_D de no más de aproximadamente 1 nanomolar.
- 45 En una realización, el ratón comprende además un reemplazo en el locus del gen de la región variable del receptor de linfocitos T de ratón endógeno con una pluralidad de segmentos de genes de la región variable del receptor de linfocitos T humanos no reordenados, en donde los segmentos del gen de la región variable del receptor de linfocitos T humanas no reordenados se recombinan para codificar un gen del receptor de linfocitos T quimérico humano-de ratón que comprende una región variable humana y una región constante de ratón. En una realización, el ratón comprende un transgén de CD8 humano, y el ratón expresa una proteína CD8 humana funcional.
- 50 Los receptores de linfocitos T que tienen una gran avidéz por los antígenos tumorales son útiles en las terapias basadas en células. Las poblaciones de linfocitos T con alta avidéz por los antígenos tumorales humanos se han preparado exponiendo linfocitos T humanos a HLA-A2 que se ha mutado para minimizar la unión de CD8 a la subunidad $\alpha 3$, para seleccionar solo aquellos linfocitos T con avidéz extremadamente alta al antígeno tumoral (es decir, clones de linfocitos T que reconocen el antígeno a pesar de la incapacidad de CD8 para unirse a $\alpha 3$). Véase, Pittet et al. (2003) $\alpha 3$ Domain Mutants of Peptide/MHC Class I Multimers Allow the Selective Isolation of High Avidity
- 55
- 60
- 65

Tumor-Reactive CD8 T Cells, J. Immunol. 171:1844-1849. Los animales no humanos y las células de los animales no humanos, son útiles para identificar péptidos que formarán un complejo con HLA humano de clase I que se unirá con gran avidez a un receptor de linfocitos T o activará un linfocito que porta un receptor de linfocitos T.

- 5 La unión de antígeno/HLA de clase I a un linfocito T, o la activación de un linfocitos T, se puede medir mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. La unión y activación de linfocitos T-APC específicas de péptido son medibles. Por ejemplo, Según se informa, el compromiso de los linfocitos T de las células presentadoras de antígeno que expresan HLA-A2 hace que PIP2 se acumule en la inmunosinapsis, mientras que la reticulación de las moléculas MHC de clase I no. Véase, Fooksman et al. (2009) Cutting Edge: Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate
10 Concentration at the APC Side of the Immunological Synapse Is Required for Effector T Cell Function, J. Immunol. 182:5179-5182.

Las consecuencias funcionales de la interacción de un linfocito que porta un TCR, y una APC que expresa clase I, también son medibles e incluyen la destrucción celular por el linfocito. Por ejemplo, según se informa, los puntos de contacto en la subunidad $\alpha 2$ de HLA-A2 por CTL CD8⁺ generan una señal para la destrucción independiente de Fas. Las células Jurkat que expresan HLA-A2 sufren apoptosis cuando se ponen en contacto (por anticuerpos) con epítomos en la molécula HLA-A2 conocida (por estudios cristalográficos) para contactar con CD8, sin ninguna dependencia aparente en el dominio citoplasmático. Véase, Pettersen et al. (1998) The TCR-Binding Region of the HLA Class I $\alpha 2$ Domain Signals Rapid Fas-Independent Cell Death: A Direct Pathway for T Cell-Mediated Killing of Target Cells? J. Immunol. 160:4343-4352. Se ha postulado que la destrucción rápida inducida por el contacto de $\alpha 2$ de HLA-A2 con un CD8 de un CTL CD8⁺ puede deberse principalmente a esta vía mediada por HLA-A2 independiente de Fas (*id.*), a diferencia de la destrucción mediada por el dominio $\alpha 3$ independiente de TCR, que por sí mismo puede inducir apoptosis (véase, Woodle et al. (1997) Antihuman class I MHC antibodies induce apoptosis by a pathway that is distinct from the Fas antigen-mediated pathway, J. Immunol. 158:2156-2164).

25 La consecuencia de la interacción entre un linfocito T y una APC que presenta un péptido en el contexto de MHC I también se puede medir mediante un ensayo de proliferación de linfocitos T. Como alternativa, se puede determinar midiendo la liberación de citocinas comúnmente asociadas con la activación de la respuesta inmunitaria. En una realización, Se puede utilizar IPN γ ELISPOT para controlar y cuantificar la activación de linfocitos T CD8⁺.

30 Tal como se describe en el presente documento, la activación de linfocitos T CD8⁺ puede verse obstaculizada en los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento debido a la unión específica de especie de CD8 a MHC I. Para ejemplos en los que se desea una interacción CD8 específica de especie, una célula de un animal genéticamente modificado como se describe en el presente documento (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata) se expone (por ejemplo, *in vitro*) a una célula humana, por ejemplo, una célula humana que porta CD8, por ejemplo, un linfocitos T humano. En un ejemplo, una célula de un ratón que expresa MHC de clase I como se describe en el presente documento se expone *in vitro* a un linfocito T que comprende un CD8 humano y un receptor de linfocitos T. En un ejemplo específico, el linfocito T es un linfocito T humano. En un ejemplo, la célula del ratón que expresa MHC de clase I comprende un péptido unido a un MHC I quimérico humano/de ratón o a un complejo de MHC I humanizado (que incluye $\beta 2$ microglobulina humana), el linfocito T es un linfocito T humano, y se determina la capacidad del linfocito T para unir la célula de ratón que presenta el péptido. En un ejemplo, se determina la activación del linfocito T humano por la célula de ratón que presenta el péptido.

45 En un ejemplo, se proporciona un método *in vitro* para medir la activación de un linfocito T humano por la célula que presenta el péptido, que comprende exponer a un ratón o una célula de ratón como se describe en el presente documento a un antígeno de interés, exponer una célula de dicho ratón o dicha célula de ratón (supuestamente portando un péptido derivado del antígeno en complejo con MHC I humano o humanizado) a un linfocito T humano, y medir la activación del linfocito T humano. En un ejemplo, el método se utiliza para identificar un epítomo de linfocitos T de un patógeno humano o una neoplasia humana. En un ejemplo, el método se utiliza para identificar un epítomo para una vacuna.

50 En un ejemplo, se divulga un método para determinar la activación de linfocitos T por un supuesto agente terapéutico humano, que comprende exponer un animal genéticamente modificado como se describe en el presente documento a un supuesto agente terapéutico humano (o, por ejemplo, exponer una célula que expresa un MHC I humano o humanizado de dicho animal a una secuencia peptídica del supuesto agente terapéutico), exponer una célula del animal genéticamente modificado que presenta un complejo MHC I humano o humanizado/ péptido a un linfocito T que comprende un receptor de linfocitos T humanos y un CD8 capaz de unirse a la célula del animal genéticamente modificado, y medir la activación del linfocito T humano que es inducida por la célula que presenta el péptido del animal genéticamente modificado.

60 En diversos ejemplos, un complejo formado entre una célula que expresa MHC de clase I humano o humanizado de un animal como se describe en el presente documento se prepara con un linfocito T que comprende una secuencia de CD8 humano, por ejemplo, un linfocito T humano o un linfocito T de un animal no humano que comprende un transgén que codifica CD8 humano. Se conocen en la técnica ratones transgénicos para CD8 humano. Tishon et al. (2000) Transgenic Mice Expressing Human HLA and CD8 Molecules Generate HLA-Restricted Measles Virus Cytotoxic T Lymphocytes of the Same Specificity as Humans with Natural Measles Virus Infection, Virology 275(2):286-293;

también, LaFace et al. (1995) Human CD8 Transgene Regulation of HLA Recognition by Murine T Cells, J. Exp. Med. 182:1315-1325.

Además de la capacidad de identificar antígenos y epítomos de antígenos de patógenos o neoplasmas humanos, los animales genéticamente modificados de la invención pueden usarse para identificar autoantígenos relevantes para enfermedades autoinmunitarias humanas, por ejemplo, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, etc. Por ejemplo, Takaki et al. ((2006) HLA-A*0201-Restricted T Cells from Humanized NOD Mice Recognize Autoantigens of Potential Clinical Relevance to Type 1 Diabetes, J. Immunol. 176:3257-65) describen la utilidad de los ratones NOD que portan monocadenas de HEA/β2 microglobulina en la identificación de autoantígenos de diabetes de tipo 1. Además, los animales genéticamente modificados de la invención pueden usarse para estudiar diferentes aspectos de enfermedades autoinmunitarias humanas. Como se sabe que algunos alelos polimórficos de MHC I humano están asociados con el desarrollo de determinadas enfermedades, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, enfermedad de Graves, miastenia grave, psoriasis, etc.; véase Bakker et al. (2006) A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC, Nature Genetics 38:1166-72 y Supplementary Information and International MHC and Autoimmunity Genetics Network (2009) Mapping of multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:18680-85), un animal genéticamente modificado de la invención que comprende un locus de MHC I humanizado que incluye dicho alelo puede ser útil como modelo de enfermedad autoinmunitaria. En una realización, el alelo de la enfermedad es HLA-B27, y la enfermedad es espondilitis anquilosante o artritis reactiva; por lo tanto, en una realización, el animal usado para el estudio de estas enfermedades comprende un HLA-B27 humano o humanizado. Se conocen otros alelos de enfermedades humanas, por ejemplo, alelos HLA de clase I asociados con VIH, infección por Ébola, etc., y estos alelos o combinación de alelos pueden ser útiles para la creación de modelos de enfermedad en un animal genéticamente modificado descrito en el presente documento.

Además, los animales genéticamente modificados de la invención y las moléculas HLA humanas o humanizadas expresadas por los mismos pueden usarse para probar anticuerpos que bloquean la presentación de antígenos por las moléculas HLA humanas asociadas con la progresión de la enfermedad humana. Por consiguiente, en el presente documento se divulga un método para determinar si un anticuerpo es capaz de bloquear la presentación de un antígeno por una molécula HLA asociada a una enfermedad humana, por ejemplo, una enfermedad humana descrita anteriormente, que comprende exponer una célula que expresa un HLA humano o humanizado descrito en el presente documento a un anticuerpo de prueba y determinar si el anticuerpo de prueba es capaz de bloquear la presentación del antígeno por un HLA humano o humanizado a las células inmunitarias (por ejemplo, a los linfocitos T), por ejemplo, midiendo su capacidad para bloquear la respuesta inmunitaria restringida por HLA humano o humanizado. En un ejemplo, el método se lleva a cabo en un animal que expresa el HLA humano o humanizado, por ejemplo, un animal que expresa HLA humano o humanizado asociado a la enfermedad que sirve como modelo de enfermedad para la enfermedad.

Otros aspectos de la inmunidad celular que implican complejos de MHC I son conocidos en la técnica; por lo tanto, los animales no humanos modificados por ingeniería genética descritos en el presente documento pueden usarse para estudiar estos aspectos de la biología inmunitaria. Por ejemplo, la unión de TCR a MHC clase I se modula *in vivo* por factores adicionales. El miembro B de la subfamilia de los receptores leucocitarios tipo inmunoglobulina (LILRB1 o LIR-1) se expresa en CTL restringidos por MHC de Clase I y regula negativamente la estimulación de linfocitos T mediante la unión de un determinante específico en la subunidad α3 de las moléculas MHC de clase I en APC. Los estudios estructurales muestran que el sitio de unión para LIR-1 y CD8 se solapan, sugiriendo que el LIR-1 inhibidor compite con el CD8 estimulante para unirse con moléculas MHC de clase I. Willcox et al. (2003) Crystal structure of HLA-A2 bound to LIR-1, a host and viral major histocompatibility complex receptor, Nature Immunology 4(9):913-919; también, Shirioishi et al. (2003) Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(15):8856-8861. LIR-1 transduce señales inhibitoras a través de su motivo de inhibición (intracelular) de inmunorreceptores basado en tirosina (ITIM). En los linfocitos NK, los estudios han demostrado que los KIR (receptores tipo Ig inhibidores de células citotóxicas) que carecen de ITIM (normalmente incapaces de inhibición) pueden inhibir en presencia de LIR-1 (supuestamente a través del ITIM de LIR-1) unidos al dominio α3 de una molécula MHC de clase I (véase, Kirwin et al. (2005) Killer Cell Ig-Like Receptor-Dealing Signaling by Ig-Like Transcript 2 (ILT2/CD85j/ILRB1/IIR-1) J. Immunol. 175:5006-5015), sugiriendo la cooperación entre LIR-1 unido a MHC de clase I y KIR y, por lo tanto, un papel para la unión del dominio α3 de HLA en la modulación de la inhibición de linfocitos NK.

Tal como se describe anteriormente, las moléculas MHC interactúan con las células que no expresan un TCR. Entre estas células están los linfocitos NK. Los linfocitos NK son linfocitos citotóxicos (que se distinguen de los CTL o linfocitos T citotóxicos) que desempeñan un papel central en la respuesta inmunitaria celular y, en particular, en la inmunidad innata. Los linfocitos NK son la primera línea de defensa contra microorganismos invasores, virus y otras entidades no propias (p. ej., tumores). Los linfocitos NK se activan o inhiben a través de receptores de superficie, y expresan CD8 pero no expresan TCR. Los linfocitos NK pueden interactuar con células que expresan MHC de clase I, pero la interacción se produce a través del dominio α3 que se unen a CD8 en lugar de los dominios α1 y α2 que se unen a TCR y que portan péptidos. Una función principal de los linfocitos NK es destruir las células que carecen de suficiente proteína de superficie MHC de clase I.

La reticulación de las moléculas MHC de clase I en la superficie de los linfocitos citotóxicos naturales (NK) da como resultado la fosforilación intracelular de tirosina, la migración de la molécula MHC de clase I desde la inmunosinapsis y la regulación negativa de la destrucción de células tumorales. Rubio et al. (2004) Cross-linking of MHC class I molecules on human NK cells inhibits NK cell function, segregates MHC I from the NK cell synapse, and induces intracellular phosphotyrosines, *J. Leukocyte Biol.* 76:116-124.

Al parecer, otra función del MHC de clase I en los linfocitos NK es evitar la autodestrucción. Los linfocitos NK llevan tanto el receptor de activación 2B4 como el ligando CD48 de 2B4; el MHC de clase I parece unirse a 2B4 y evitar su activación por CD48. Betser-Cohen (2010) The Association of MHC Class I Proteins with the 2B4 Receptor Inhibits Self-Killing of Human NK Cells, *J. Immunol.* 184:2761-2768.

Por consiguiente, los animales no humanos modificados por ingeniería genética descritos en el presente documento pueden usarse para estudiar estos procesos no mediados por TCR ni por CTL y para diseñar enfoques para su modulación.

Ejemplos

La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes. Estos Ejemplos se exponen para ayudar en la comprensión de la invención, pero no pretenden, y no deben interpretarse como que limitan su alcance de ninguna manera. Los Ejemplos no incluyen descripciones detalladas de métodos convencionales que serían bien conocidos para los expertos en la materia (técnicas de clonación molecular, etc.). A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura se indica en grados Celsius, y la presión es la atmosférica o casi atmosférica.

25 **Ejemplo 1. Construcción y Caracterización de Ratones con HLA-A2 Genéticamente Modificados**

Ejemplo 1,1: Expresión de HLA-A2/H-2K en células MG87.

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

Brevemente, se preparó una construcción vírica quimérica de HLA-A humano/H-2K de ratón utilizando las secuencias de exón que codifican los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de la cadena α y clonándolas en marco con las secuencias codificantes de ratón para los dominios transmembrana y citoplasmáticos del gen H-2K (FIG. 4A, pMIG-HLA-A2/H2K). Como se ilustra en la FIG. 4, la construcción contenía una secuencia indicadora IRES-GFP, que permitió determinar si la construcción podía expresarse en células tras la transfección.

Los virus que contienen la construcción quimérica descrita anteriormente se prepararon y propagaron en células de riñón embrionario humano 293 (293T). Las células 293T se sembraron en placas de 10 cm y se dejaron crecer hasta un 95 % de confluencia. Se preparó una mezcla de transfección de ADN con 25 μ g de pMIG-HLA-A2/H2K, pMIG-HLA-A2 humano o pMIG- $\beta 2$ microglobulina humanizada, y 5 μ g de pMDG (plásmido envolvente), 15 μ g de pCL-Eco (construcción de empaquetamiento sin señal de empaquetamiento Ψ), 1 ml de Opti-MEM (Invitrogen). A esta mezcla de ADN de 1 ml se añadieron 80 μ l de Lipofectamine-2000 (Invitrogen) en 1 ml de Opti-MEM, que previamente se mezcló y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. La mezcla de lipofectamine/ADN se dejó incubar durante 20 minutos adicionales a temperatura ambiente, y después se añadió a placas de 10 cm, y las placas se incubaron a 37 °C. Se recogieron medios de las células después de 24 horas y se añadieron a las células 10 ml nuevos de medio R10 (RPMI 1640 + FBS al 10 %). Este intercambio de medios se repitió dos veces. Después de un total de cuatro días, los medios recogidos se agruparon, se centrifugaron y se pasaron a través de un filtro estéril para eliminar los residuos celulares.

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

Los gráficos (Figura 4B), así como la tabla que resume los datos obtenidos de los gráficos (Figura 4C) demuestran que la cotransducción con $\beta 2$ microglobulina humanizada aumenta la expresión de HLA-A2 humano o HLA-A2/H-2K quimérico humano/no humano, como lo demuestra el desplazamiento de las curvas hacia la derecha.

Ejemplo 1.2. Modificación por Ingeniería de un Locus Quimérico HLA-A2/H-2K.

El gen H-2K de ratón se humanizó en una única etapa mediante la construcción de un único vector de direccionamiento a partir de ADN (BAC) de cromosoma artificial bacteriano humano y de ratón utilizando la tecnología VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. 6.586.251 y Valenzuela et al. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. Nat. Biotech. 21(6): 652-659). Se modificó ADN del clon BAC RP23-173k21 de ratón (Invitrogen) mediante recombinación homóloga para reemplazar el ADN genómico que codifica los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del gen H-2K de ratón con ADN genómico humano que codifica las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del gen HLA-A humano (FIG. 5).

Brevemente, la secuencia genómica que codifica las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de ratón del gen H-2K se reemplaza con el ADN genómico humano que codifica los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del gen HLA-A*0201 humano en un único evento de direccionamiento usando un vector de direccionamiento que comprende un casete de higromicina flanqueado por sitios *loxP* con un brazo de homología 5' de ratón que contiene la secuencia 5' del locus H-2K de ratón que incluye la región no traducida 5' (UTR; el brazo de homología 5' se expone en la SEQ ID NO: 1) y un brazo de homología 3' de ratón que contiene la secuencia genómica 3' de la secuencia codificante de $\alpha 3$ de H-2K de ratón (el brazo de homología 3' se expone en la SEQ ID NO: 2).

La construcción final para dirigir el locus de gen H-2K endógeno de 5' a 3' incluía (1) un brazo de homología 5' que contenía -200 pb de secuencia genómica de ratón 5' del gen H-2K endógeno que incluye la 5'UTR, (2) -1339 pb de secuencia genómica humana que incluye la secuencia líder de HLA-A*0201, la líder/intrón $\alpha 1$ de HLA-A*0201, el exón $\alpha 1$ de HLA-A*0201, el intrón $\alpha 1$ - $\alpha 2$ de HLA-A*0201, el exón $\alpha 2$ de HLA-A*0201, -316 pb del extremo 5' del intrón $\alpha 2$ - $\alpha 3$, (3) un sitio *loxP* 5', (4) un casete de higromicina, (5) un sitio *loxP* 3', (6) -580 pb de una secuencia genómica humana que incluye -304 pb del extremo 3' del intrón $\alpha 2$ - $\alpha 3$, el exón $\alpha 3$ de HLA-A*0201 y (7) un brazo de homología 3' que contiene -200 pb de secuencia genómica de ratón que incluye el intrón entre las secuencias codificantes de $\alpha 3$ de H-2K de ratón y de transmembrana (véase FIG. 5 para la representación esquemática del vector de direccionamiento de H-2K). La secuencia de 149 nucleótidos en el punto de unión de las secuencias de ratón/humano en el 5' del vector de direccionamiento se expone en la SEQ ID NO: 3 y la secuencia de 159 nucleótidos en el punto de unión de las secuencias humana/de ratón en el 3' del vector de direccionamiento se expone en la SEQ ID NO: 4. La recombinación homóloga con este vector de direccionamiento creó un locus H-2K de ratón modificado que contenía ADN genómico humano que codificaba los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del gen HLA-A*0201 operativamente unido a las secuencias codificantes de dominios transmembrana y citoplasmáticos de H-2K de ratón endógeno que, tras su traducción, lleva a la formación de una proteína MHC de clase I quimérica humana/de ratón.

El ADN de BAC dirigido se usó para electroporar células ES F1H4 de ratón para crear células Es modificadas para generar ratones que expresan una proteína MHC de clase I quimérica sobre la superficie de células nucleadas (por ejemplo, linfocitos T y B, macrófagos, neutrófilos). Las células Es que contienen una inserción de secuencias HLA humanas se identificaron mediante ensayo TAQMAN™ cuantitativo. Se diseñaron sondas y conjuntos de cebadores específicos para detectar la inserción de secuencias de HLA humanas y casetes de selección asociados (ganancia de alelo, GOA) y pérdida de secuencias de ratón endógenas (pérdida de alelo, LOA). La Tabla 1 identifica los nombres y localizaciones detectados para cada una de las sondas usadas en los ensayos de PCR cuantitativa.

Tabla 1: Sondas Utilizadas para Confirmar el Gen Quimérico HLA-A2/H-2K

Sonda	Ensayo	Región detectada por sonda	Secuencia	SEQ ID NO
HYG	GOA	Casete de higromicina	ACGAGCGGGT TCGGCCCATTC C	5
1665H1	GOA	Intrón $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de HLA-A2 humano	AGTCCTTCAG CCTCCACTCA GGTCAGG	6
1665H2	GOA	Exón $\alpha 2$ de HLA-A2 humano	TACCACCAGT ACGCCTACGA CGGCA	7
5112H2	GOA	Intrón $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de HLA-A2 humano	CACTCTCTGGTACAGGAT	8

El casete de selección puede eliminarse mediante métodos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, las células ES que portan el locus del MHC de clase I quimérico humano/de ratón puede transfectarse con una construcción que expresa Cre para eliminar el casete de higromicina "*con sitio lox*" introducido mediante la inserción de la construcción de direccionamiento que contiene secuencias de gen de HLA-A*0201 humano (véase FIG. 5). El casete de higromicina puede eliminarse opcionalmente cruzando con ratones que expresan Cre recombinasa. Opcionalmente, el casete de higromicina se conserva en los ratones.

Las células ES dirigidas anteriormente descritas se utilizaron como células ES donantes y se introdujeron en un

embrión de ratón en la fase de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. n.º 7.294.754 y Poueymirou et al. (2007) F0 generation mice that are essentially fully derived from the donor genotargeted ES cells allowing immediate phenotypic analyses Nature Biotech. 25(1):91-99). VELOCIMICE® (ratones F0 completamente derivados de la célula ES donadora) que portaban independientemente un gen del MHC de clase I quimérico se identificaron mediante genotipificación usando un ensayo de modificación de alelo (Valenzuela *et al.*, *supra*) que detecta la presencia de las secuencias de gen de HLA-A*0201 humanas únicas.

Ejemplo 1.3. Expresión In Vivo de HLA-A/H-2K Quimérico en Ratones Genéticamente Modificados.

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

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

Ejemplo 2: Construcción y Caracterización de Ratones con β 2 Microglobulina Genéticamente Modificados

Ejemplo 2.1: Modificación por Ingeniería de un Locus de β 2 Microglobulina Humanizada

El gen de β 2 microglobulina (β 2m) de ratón se humanizó en una única etapa mediante la construcción de un único vector de direccionamiento a partir de ADN (BAC) de cromosoma artificial bacteriano humano y de ratón utilizando la tecnología VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. 6.586.251 y Valenzuela et al., *supra*).

Brevemente, se generó un vector de direccionamiento mediante recombinación homóloga bacteriana que contenía brazos de homología de β 2m de ratón cadena arriba y cadena abajo del clon BAC 89C24 de la biblioteca RPCI-23 (Invitrogen). Los brazos de homología de ratón se modificaron por ingeniería para flanquear un fragmento de ADN de β 2m humana de 2,8 kb que se extiende desde el exón 2 hasta aproximadamente 267 nucleótidos cadena abajo del exón 4 no codificante (FIG. 7). Se modificó por ingeniería un casete de selección de fármacos (neomicina) flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinasas (por ejemplo, sitios loxP) en el vector de direccionamiento para permitir la selección posterior. El vector de direccionamiento final se linealizó y se electroporó en una línea de células ES F1H4 de ratón (Valenzuela et al., *supra*).

Los clones de células ES dirigidas con el casete de fármacos eliminado (mediante la introducción de la Cre recombinasa) se introdujeron en un embrión de ratón en etapa de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 7.294.754 y Poueymirou et al., *supra*). Se identificaron VELOCIMICE® (ratones F0 completamente derivados de la célula ES donante) que portaban el gen de β 2m humanizada por exploración de la pérdida de alelo de ratón y ganancia de alelo humano utilizando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela et al., *supra*).

Ejemplo 2.2: Caracterización de Ratones con β 2 microglobulina Humanizada

Se evaluaron ratones heterocigotos para un gen de β 2 microglobulina (β 2m) humanizada para determinar la expresión usando citometría de flujo (Figuras 8 y 9).

Brevemente, se aisló sangre de grupos (n = 4 por grupo) de ratones de tipo silvestre, con β 2m humanizada, con MHC humanizado (es decir, HLA humano) de clase I, y con β 2m y MHC de clase I doblemente humanizados usando técnicas conocidas en la técnica. La sangre de cada uno de los ratones de cada grupo se trató con tampón de lisis ACK (Lonza, Walkersville, MD, EE. UU.) para eliminar los glóbulos rojos. Las células restantes se tiñeron usando anticuerpos anti-CD3 (17A2), anti-CD19 (1D3), anti-CD11b (M1/70), anti-HLA de clase I humano y anti- β 2 microglobulina humana (2M2) conjugados con fluorocromos. La citometría de flujo se realizó con BD-FACSCANTO™ (BD Biosciences).

La expresión de HLA de clase I humano se detectó en células de animales humanizados simples y doblemente humanizados, mientras que la expresión de β 2 microglobulina solo se detectó en células de ratones doblemente humanizados (FIG. 8). La coexpresión de β 2m humana y HLA de clase I humano dio como resultado un aumento de la cantidad detectable de HLA de clase I humano en la superficie celular en comparación con la expresión de HLA de clase I humano en ausencia de β 2m humana (FIG.9; intensidad fluorescente media de 2370 frente a 1387).

Ejemplo 3. Respuesta Inmunitaria a Péptidos de los Virus de la Gripe y de Epstein-Barr (EBV) Presentados por APC de Ratones Genéticamente Modificados que Expresan HLA-A2/H-2K y β 2 microglobulina Humanizada.

Las PBMC de varios donantes humanos se exploraron tanto para determinar la expresión de HLA-A2 como su

capacidad para generar una respuesta a péptidos de la gripe y de EBV. Se seleccionó un único donante para experimentos posteriores.

5 Los linfocitos T humanos se aíslan de las PBMC del donante seleccionado usando selección negativa. Las células
 10 esplénicas no T se aislaron de un ratón heterocigoto para un HLA-A2/H-2K quimérico y heterocigótico para un gen de
 β2-microglobulina humanizada, y de un ratón de tipo silvestre. Se agregaron aproximadamente 50.000 células
 esplénicas no T de los ratones a una placa Elispot recubierta con anticuerpo anti-IFN γ humano. Se añadió péptido de
 gripe (10 micromolar) o un grupo de péptidos de EBV (5 micromolar cada uno). Se añadió Poli IC a 25
 microgramos/pocillo, y los pocillos se incubaron durante tres horas a 37 °C con 5 % de CO $_2$. Se añadieron linfocitos T
 humanos (50.000) y anti-CD28 humano a las células esplénicas no T y a los péptidos, y los pocillos se incubaron
 durante 40 horas a 37 °C con 5 % de CO $_2$, después de lo cual se realizó un ensayo de IFN γ Elispot.

15 Como se muestra en la FIG. 10, los linfocitos T humanos fueron capaces de montar una respuesta a los péptidos de
 la gripe y de EBV cuando fueron presentados por APC de ratón que expresaban el HLA-A2/H-2K quimérico y la β2
 microglobulina humanizada en su superficie.

Ejemplo 4: Construcción y Caracterización de Ratones con HLA-B27 Genéticamente Modificados

Ejemplo 4.1: Modificación por Ingeniería de un Locus Quimérico HLA-B27/H-2D1

20 El gen H-2D1 (Histocompatibilidad 2, locus 1 de región D) de ratón se humanizó en una única etapa mediante la
 construcción de un único vector de direccionamiento a partir de ADN (BAC) de cromosoma artificial bacteriano humano
 y de ratón utilizando la tecnología de VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. 6.586.251 y
 Valenzuela et al. (2003), *supra*). El ADN del clon bMQ300c10 de BAC de ratón (Invitrogen) se modificó por
 25 recombinación homóloga para reemplazar el ADN genómico que codifica los dominios α1, α2 y α3 del gen H-2D1 de
 ratón con ADN genómico humano que codifica las subunidades α1, α2 y α3 del gen HLA-B27 humano (FIG. 11).

30 Brevemente, la secuencia genómica que codifica las subunidades α1, α2 y α3 de ratón del gen H-2D1 se reemplaza
 con el ADN genómico humano que codifica la α1, α2 y α3 del gen HLA-B27 humano (subtipos B*2701-2759) en un
 evento de direccionamiento único usando un vector de direccionamiento que comprende un brazo de homología 5' de
 ratón que contiene la secuencia 5' del locus H-2D1 de ratón que incluye el exón de la secuencia líder y un brazo de
 homología 3' de ratón que contiene la secuencia genómica 3' de la secuencia poliA de H-2D1 de ratón.

35 La construcción final para dirigir al locus del gen H-2D1 endógeno de 5' a 3' incluyó (1) un brazo de homología 5' que
 contiene 49,8 kb de secuencia genómica de ratón 5' del gen H-2D1 endógeno que incluye el exón y el intrón de la
 secuencia líder (2) 1,67 kb de secuencia genómica humana que incluye el exón α1 de HLA-B27, el intrón α1-α2 de
 HLA-B, el exón α2 de HLA-AB, el intrón α2-α3 de HLA-B con un sitio de inserción 5' loxP, el exón α3 de HLA-AB, (3)
 40 1,8 kb del intrón α3 de H-2D1 de ratón, los exones codificantes transmembrana y citoplasmáticos de H-2D1 y la
 secuencia de poliA, (4) un sitio 5' FRT, (5) un casete de higromicina, (6) un sitio 3' FRT, (7) un sitio 3' loxP y (8) un
 brazo de homología 3' que contiene 155,6 kb de secuencia genómica de ratón cadena abajo del gen H-2D1 de ratón
 (véase la FIG. 11 para la representación esquemática del vector de direccionamiento de H-2D1). La secuencia de 199
 nucleótidos en la unión de las secuencias de ratón/humanas en el extremo 5' del vector de direccionamiento se expone
 en la SEQ ID NO: 9, la secuencia de 134 nucleótidos que comprende la inserción de loxP con sus secuencias humanas
 45 circundantes dentro del vector de direccionamiento se expone en la SEQ ID NO: 10, La secuencia de 200 nucleótidos
 en la unión de las secuencias humana/de ratón en el extremo 3' del vector de direccionamiento se expone en la SEQ
 ID NO: 11, la secuencia en la unión 5' de la secuencia de ratón y el casete de selección FRT-HYG-FRT se expone en
 la SEQ ID NO: 12, y la secuencia en la unión 3' del casete FRT-HYG-FRT y la secuencia de ratón se exponen en la
 SEQ ID NO: 13. La recombinación homóloga con este vector de direccionamiento creó un locus H-2D1 de ratón
 50 modificado que contenía ADN genómico humano que codificaba los dominios α1, α2 y α3 del gen HLA-B27
 operativamente unido a las secuencias codificantes de los dominios transmembrana y citoplasmáticos de H-2D1 de
 ratón endógena que, tras su traducción, lleva a la formación de una proteína MHC de clase I quimérica humana/de
 ratón.

55 El ADN de BAC dirigido se usó para electroporar células ES F1H4 de ratón para crear células Es modificadas para
 generar ratones que expresan una proteína MHC de clase I quimérica sobre la superficie de células nucleadas (por
 ejemplo, linfocitos T y B, macrófagos, neutrófilos). Las células Es que contienen una inserción de secuencias HLA
 humanas se identificaron mediante ensayo TAQMAN™ cuantitativo. Se diseñaron sondas y conjuntos de cebadores
 60 específicos para detectar la inserción de secuencias de HLA humanas y casetes de selección asociados (ganancia de
 alelo, GOA) y pérdida de secuencias de ratón endógenas (pérdida de alelo, LOA). La Tabla 2 identifica los nombres y
 localizaciones detectados para cada una de las sondas usadas en los ensayos de la PCR cuantitativa; estas sondas
 se representan esquemáticamente en la FIG. 11.

65

Tabla 2: Sondas Utilizadas para Confirmar el Gen Quimérico HLA-B27/H-2D

Sonda	Ensayo	Región detectada por sonda	Secuencia	SEQ ID NO
HYG	GOA	Casete de higromicina	ACGAGCGGGT TCGGCCATT C	5
936hTU	GOA	Exón $\alpha 1$ de HLA-B27 humano	TGCAAGGCCAAGGCACAGACT	14
936hTD	GOA	Intrón $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de HLA-B27 humano	TGCAAAGCGCCTGAATTTTCTGACTC	15
5152TUP	LOA	Exón $\alpha 1$ de H-2D1 de ratón	CTCTGTCGGCTATGTGG	16
5152TDP	Retención	Región citoplasmática-H de ratón	TGGTGGGTTGCTGGAA	17

Se puede inducir que el alelo HLA-B27/H2-D1 se elimine condicionalmente cruzando con una cepa de ratón eliminadora de Cre. Por ejemplo, los ratones que portan el locus de MHC de clase I quimérico humano/de ratón pueden cruzarse con ratones transgénicos que expresan Cre recombinasa en un linaje celular específico para eliminar las regiones transmembrana y citoplasmáticas de HLA-B27 $\alpha 3$ humano "con sitio lox" y de H2-D1 de ratón flanqueadas por los sitios loxP 5 'y 3' en la construcción de direccionamiento (Véase la FIG. 11).

El casete de selección puede eliminarse mediante métodos conocidos por un experto en la materia. Por ejemplo, las células ES que portan el locus del MHC de clase I quimérico humano/de ratón pueden transfectarse con una construcción que expresa FlpO para eliminar el casete de higromicina "con *FRT*" introducido mediante la inserción de la construcción de direccionamiento que contiene secuencias del gen HLA-B27 humano (véase FIG. 11). El casete de higromicina puede eliminarse opcionalmente cruzando con ratones que expresan FlpO recombinasa. Opcionalmente, el casete de higromicina se conserva en los ratones.

Las células ES dirigidas anteriormente descritas se utilizaron como células ES donantes y se introdujeron en un embrión de ratón en la fase de 8 células mediante el método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 7.294.754 y Poueymirou et al. (2007), *supra*). VELOCIMICE® (ratones F0 completamente derivados de la célula ES donante) que portaban independientemente un gen de MHC de clase I quimérico se identificaron mediante genotipificación usando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela *et al.*, *supra*) que detecta la presencia de las secuencias del gen HLA-B27 humano únicas.

Ejemplo 4.2: Expresión de HLA-B27/H-2D1 Quimérico en Ratones Genéticamente Modificados

Se recogió sangre de ratones heterocigotos tanto para B2M humanizada como HLA-B27/H-2D1 quimérico y sus compañeros de camada de tipo silvestre en tubos de microtainer con EDTA (BD). La sangre se tiñó con 1 mg/ml de anticuerpo primario (W6/32-PE, pan anticuerpo de HLA-Clase I, Abcam; o anticuerpo anti-b2m humana) durante 25 minutos a 4 °C seguido de lavado con tampón FACS e incubación con dilución 1:300 del anticuerpo secundario anti-IgG humana marcado con APC (Jackson ImmunoResearch) durante 20 minutos a 4 °C. Los glóbulos rojos se lisaron con solución Fix/lyse de 1 etapa (eBiosciences) y las células se fijaron y se volvieron a suspender en 1x BD Stabilizing Fixative. Las células se adquirieron en una máquina FACS Canto y los datos se analizaron utilizando el software FlowJo.

Como se representa gráficamente en la FIG. 12, La proteína quimérica HLA-B27/H-2D1 y la B2M humanizada se expresaron en células sanguíneas de animales modificados por ingeniería genética (como lo demuestra la detección por anticuerpos generados contra HLA-B27 humano y B-2M humana), mientras que su expresión no se detectó en animales de tipo silvestre.

Equivalentes

Los expertos en la materia reconocerán o serán capaces de determinar, usando únicamente experimentación de rutina, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. Se pretende que tales equivalentes estén abarcados por las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MACDONALD, Lynn MURPHY, Andrew J. GURER, Cagan MCWHIRTER, John VORONINA, Vera HARRIS, Faith STEVENS, Sean XUE, Yingzi

<120> Animales con Complejo Mayor de Histocompatibilidad Modificados Genéticamente

<130> 0825B

<150> 61/552.582

<151> 28/10/2011

ES 2 764 829 T3

<150> 61/552.587
<151> 28/10/2011

5 <150> 61/700.908
<151> 14/09/2012

<150> 13/661.159
<151> 26/10/2012

10 <160> 17

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1
<211> 200
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Brazo de homología 5' de la construcción de direccionamiento de MHC I

<400> 1

ggattcccca tctccacagt ttcacttctg cacctaacct gggtcaggtc cttctgtccg 60

gacactgttg acgcgcagtc agctcttacc ccattgggt ggcgcgatca cccaagaacc 120

aatcagtgtc gccgcggacg ctggatataa agtccacgca gcccgcagaa ctcagaagtc 180

25 gcgaatcgcc gacaggtgcg 200

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

30 <220>
<223> Brazo de homología 3' de la construcción de direccionamiento de MHC I

35 <400> 2

gtaaggagag tgtgggtgca gagctgggggt cagggaaagc tggagctttc tgcagaccct 60

gagctgctca gggctgagag ctgggggtcat gaccctcacc ttcatttctt gtacctgtcc 120

ttcccagagc ctcctccatc cactgtctcc aacatggcga ccgttgctgt tctgggtgtc 180

cttggagctg caatagtcac 200

40 <210> 3
<211> 149
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<223> Secuencia del locus de MHC I quimérico humano/de ratón en la unión 5' de secuencias de ratón/humanas

50 <400> 3

ES 2 764 829 T3

	agtgtcgccg cggacgctgg atataaagtc cacgcagccc gcagaactca gaagtcgcga	60
	atcgccgaca ggtgcatgg ccgtcatggc gccccgaacc ctcgctctgc tactctcggg	120
	ggctctggcc ctgaccaga cctgggcgg	149
5	<210> 4 <211> 159 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Secuencia del locus de MHC I quimérico humano/de ratón en la unión 3' de secuencias humanas/de ratón	
	<400> 4	
	ggtggtgcct tctggacagg agcagagata cacctgccat gtgcagcatg agggtttgcc	60
	caagcccctc accctgagat ggggtaagga gagtgtgggt gcagagctgg ggtcagggaa	120
	agctggagct ttctgcagac cctgagctgc tcagggctg	159
15	<210> 5 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Sonda para la detección de casete de higromicina	
25	<400> 5 acgagcgggt tcggccatt c	21
30	<210> 6 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Sonda para la detección de intrón alfa2-alfa3 de HLA-A2 humano	
35	<400> 6 agtcttcag cctccactca ggtcagg	27
40	<210> 7 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Sonda para la detección de exón alfa2 de HLA-A2 humano	
45	<400> 7 taccaccagt acgcctacga cggca	25
50	<210> 8 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Sonda para la detección de intrón alfa2-alfa3 de HLA-A2 humano	
	<400> 8	

ES 2 764 829 T3

	cactctctgg tacaggat	18
5	<210> 9 <211> 199 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Secuencia del locus de MHC I quimérico humano/de ratón en la unión 5' de secuencias de ratón/humanas <400> 9	
	cccttctcca cctgagcccc gcgcccagat ccctccccgg cctgcgccagc cgccccgggt	60
	ttggtgagga ggtcggggtc tcaccgcgcg ccgtccccag gctcccactc catgaggtat	120
	ttccacacct ccgtgtcccc gcccgccgc ggggagcccc gcttcatcac cgtgggctac	180
	gtggacgaca cgctgttcg	199
15	<210> 10 <211> 134 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Secuencia de locus de MHC I quimérico humano/de ratón que rodea el sitio 5' loxP <400> 10	
	tccttgttcc ccgctcagag actcgaactt tccaatgaat aggagattat cataacttcg	60
	tataatgtat gctatacgaa gttatccagg tgctgcgtc caggctggtg tctgggttct	120
25	gtgcccccttc ccca	134
30	<210> 11 <211> 200 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Secuencia de locus de MHC I quimérico humano/de ratón en la unión 3' de secuencias humanas/de ratón <400> 11	
	agaagtgggc agctgtggtg gtgccttctg gagaagagca gagatacaca tgccatgtac	60
	agcatgaggg gctgccgaag ccctcacc tgagatgggg tgtgggtgca gagctgggg	120
	cagggaaagc tggagccttc tgcagaccct gagctggtca gggatgagag ctggggctcat	180
	aaccctcacc ttcatttct	200
40	<210> 12 <211> 120 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Secuencia en la unión 5' de la inserción de FRT-HYG-FRT <400> 12	

ES 2 764 829 T3

	agactcaact agggatcctt taatgtgctg ggtgtacaag acaattcacc catttcctct	60
	gctcgagcga agttcctata ctttctagag aataggaact tcggaatagg aacttccgga	120
5	<210> 13 <211> 120 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Secuencia en la unión 3' de la inserción de FRT-HYG-FRT <400> 13	
	ataggaactt ctcgagccca taacttcgta taatgtatgc tatacgaagt tatcccgggtg	60
	cacccatccc ttttagctac taatgatgct gtgttgaagc tgcctgggc tctccctgtc	120
15	<210> 14 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Sonda de detección	
25	<400> 14 bgcaaggcca aggcacagac t	21
30	<210> 15 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Sonda de detección	
35	<400> 15 tgcaaagcgc ctgaatttc tgactc	26
40	<210> 16 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Sonda de detección	
45	<400> 16 ctctgtcggc tatgtgg	17
50	<210> 17 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Sonda de detección	
55	<400> 17 tgggggttg ctggaa	16

REIVINDICACIONES

1. Un ratón que comprende en un locus H-2D endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón,
 5 en donde el polipéptido quimérico comprende los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un polipéptido HLA-B27 humano y dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido H-2D de ratón; y en donde el ratón expresa el polipéptido quimérico.
2. El ratón de la reivindicación 1, en donde el ratón no expresa un dominio extracelular funcional de un polipéptido H-2D de ratón a partir de un locus H-2D endógeno.
 10
3. El ratón de la reivindicación 1, en donde el locus H-2D endógeno carece de una secuencia de nucleótidos endógena que codifique los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un polipéptido H-2D de ratón.
- 15 4. El ratón de la reivindicación 1, en donde la secuencia de nucleótidos:
- (a) comprende una secuencia de nucleótidos líder de H-2D de ratón endógeno; y/o
 - (b) está operativamente unida a elementos reguladores de ratón endógenos; y/o
 - (c) comprende exón $\alpha 1$ de HLA-B27 humano, un intrón $\alpha 1$ - $\alpha 2$ de HLA-B27 humano, un exón $\alpha 2$ de HLA-B27 humano, un intrón $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de HLA-B27 humano y un exón $\alpha 3$ de HLA-B27 humano.
 20
5. Un roedor que comprende en un locus de MHC I endógeno dos o más secuencias de nucleótidos que codifican dos o más polipéptidos de MHC I quimérico humano/de roedor,
 25 en donde cada uno de los polipéptidos quiméricos comprende los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un polipéptido de MHC I humano y los dominios transmembrana y citoplasmáticos de un polipéptido de MHC I de roedor, en donde el roedor expresa los dos o más polipéptidos de MHC I quimérico humano/de roedor y en donde el roedor es un ratón o una rata.
6. El roedor de la reivindicación 5, en donde el roedor es un ratón, y en donde el polipéptido de MHC I de roedor es un polipéptido H-2D de ratón, un polipéptido H-2K de ratón o un polipéptido H-2L de ratón.
 30
7. El ratón de la reivindicación 6 que comprende en un locus de MHC I endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico HLA-A2/H-2K y una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido quimérico HLA-B27/H-2D,
 35 en donde el ratón expresa los polipéptidos quiméricos HLA-A2/H-2K y HLA-B27/H-2D, y opcionalmente, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido quimérico HLA-A2/H-2K se encuentra en un locus H-2K endógeno, y la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido quimérico HLA-B27/H-2D se encuentra en un locus H-2D endógeno.
- 40 8. El ratón de la reivindicación 5 o 7 en donde el ratón no expresa un polipéptido de MHC I endógeno funcional.
9. El ratón o rata de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende adicionalmente en un locus de $\beta 2$ microglobulina endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada, en donde el ratón o rata expresa el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada.
 45
10. El ratón o rata de la reivindicación 9, en donde el ratón o la rata no expresa una $\beta 2$ microglobulina endógena funcional a partir de un locus de $\beta 2$ microglobulina endógeno, y opcionalmente, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada está operativamente unida a elementos reguladores de $\beta 2$ microglobulina de rata o de ratón endógenos.
 50
11. El ratón o rata de la reivindicación 9, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada:
- (a) comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en el exón 2 al exón 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana; o
 - (b) comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en el exón 2, exón 3 y exón 4 de un gen de $\beta 2$ microglobulina humana.
 55
12. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón, que comprende:
 60 una primera secuencia de nucleótidos que codifica los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un polipéptido HLA-B27 humano unida operativamente a una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático de un polipéptido H-2D de ratón.
- 65 13. Un método para modificar un locus H-2D endógeno de un ratón para expresar un polipéptido de MHC I quimérico humano/de ratón, en donde el método comprende reemplazar en el locus H-2D endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un polipéptido H-2D de ratón con una secuencia de nucleótidos

que codifica los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un polipéptido HLA-B27 humano.

14. El método de la reivindicación 13, en donde el reemplazo se realiza en una única célula ES, y la única célula ES se introduce en un embrión de ratón para producir un ratón.

5

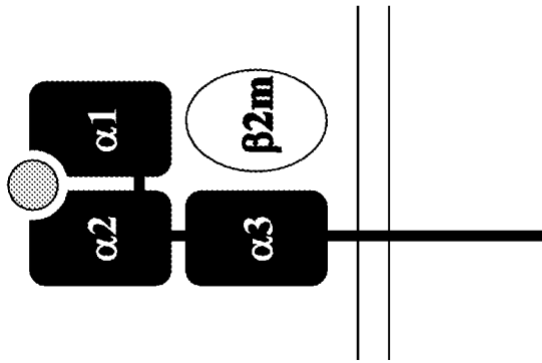


FIG. 1

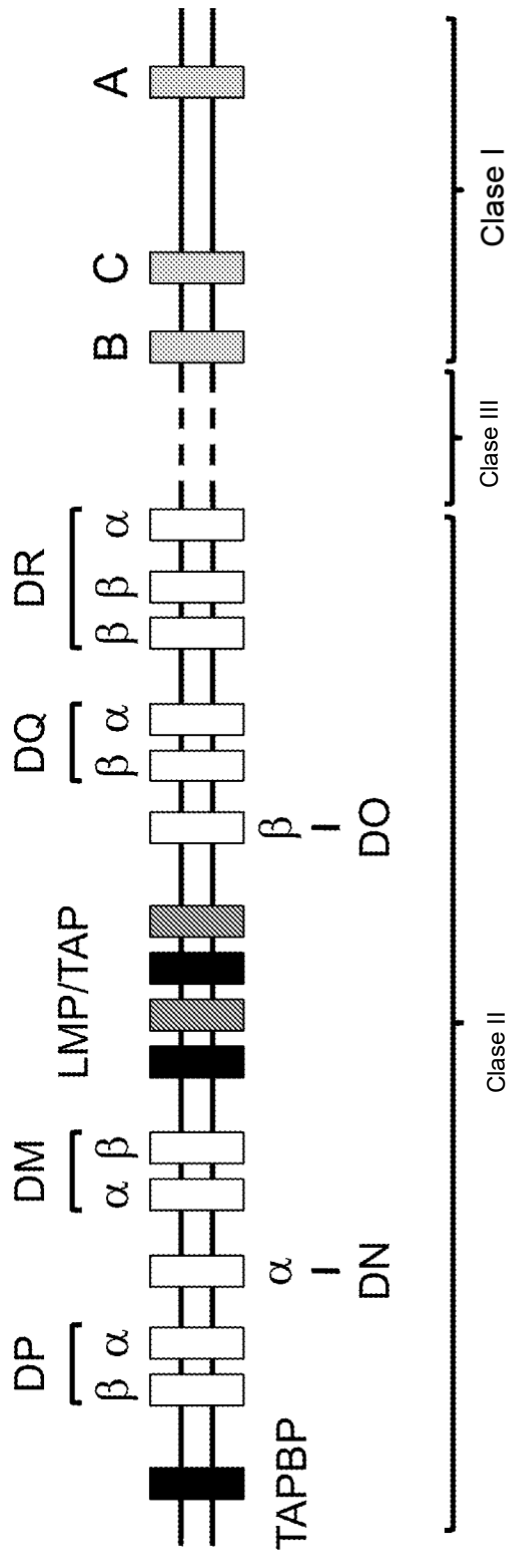


FIG. 2

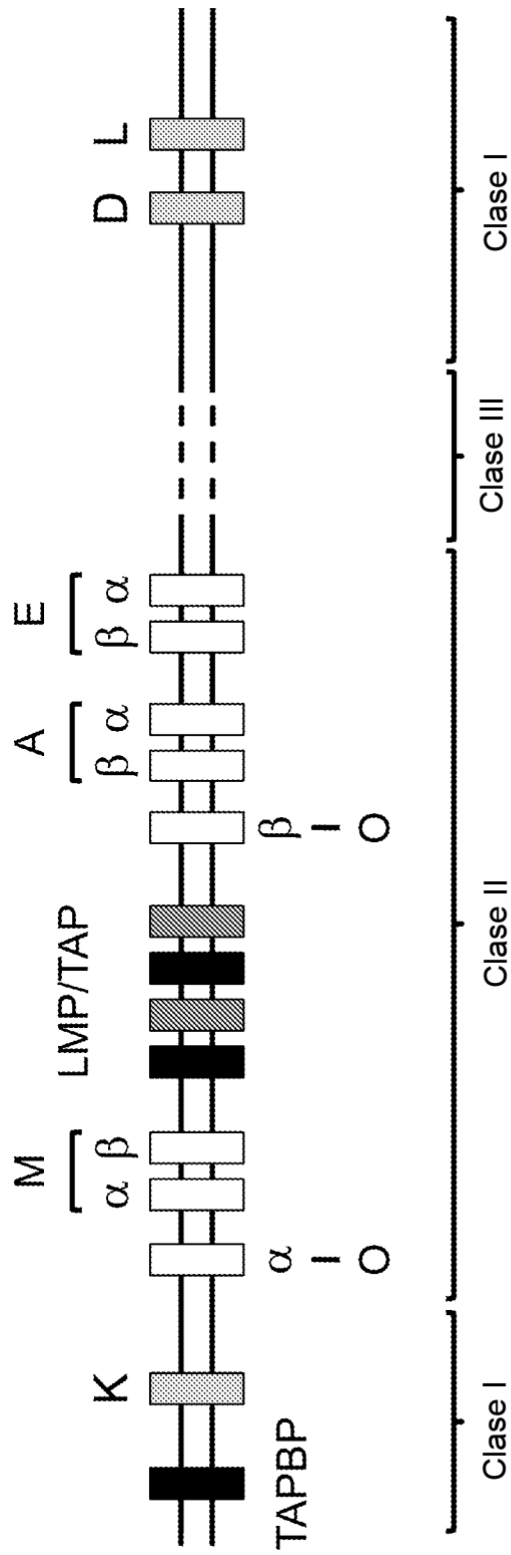


FIG. 3

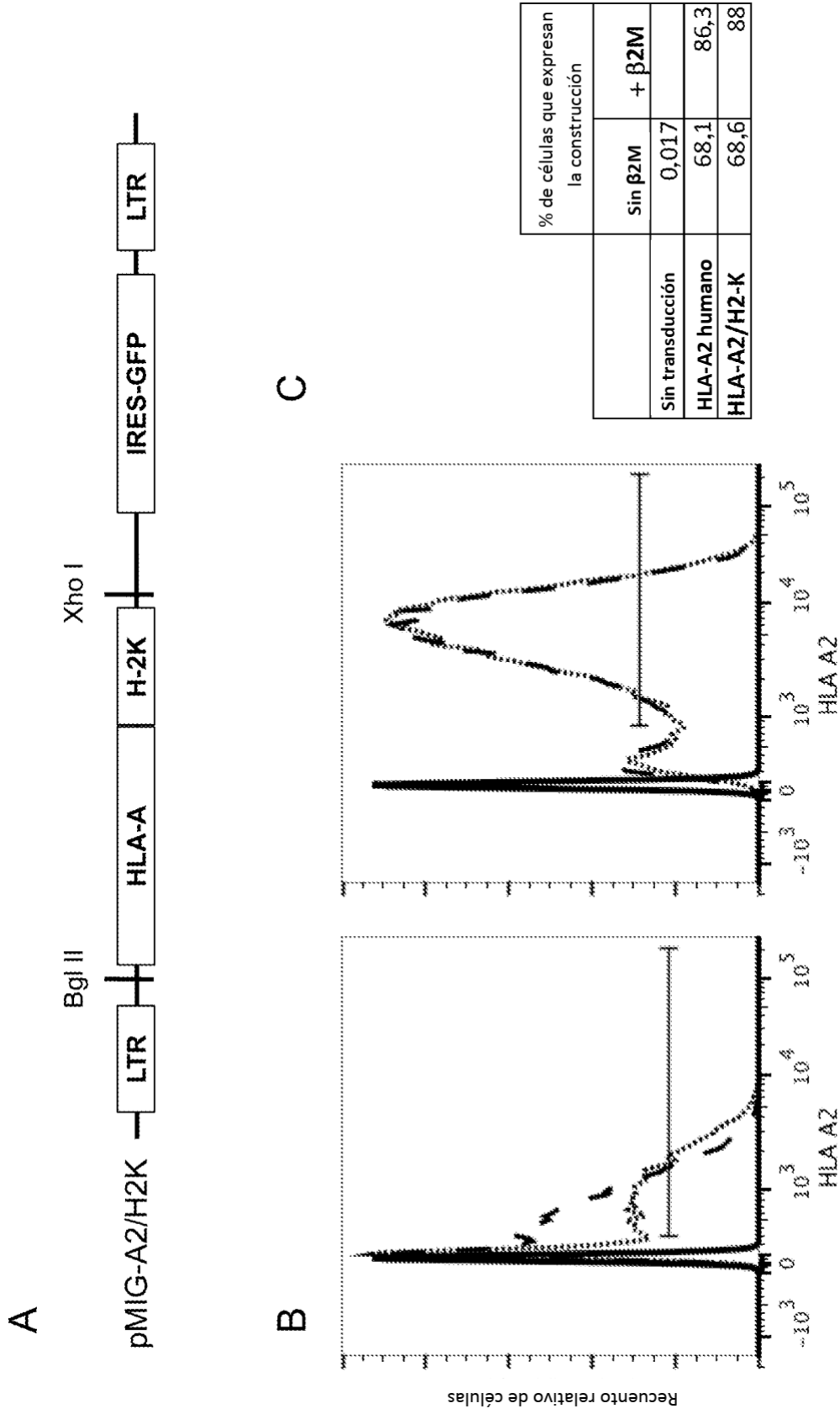


FIG. 4

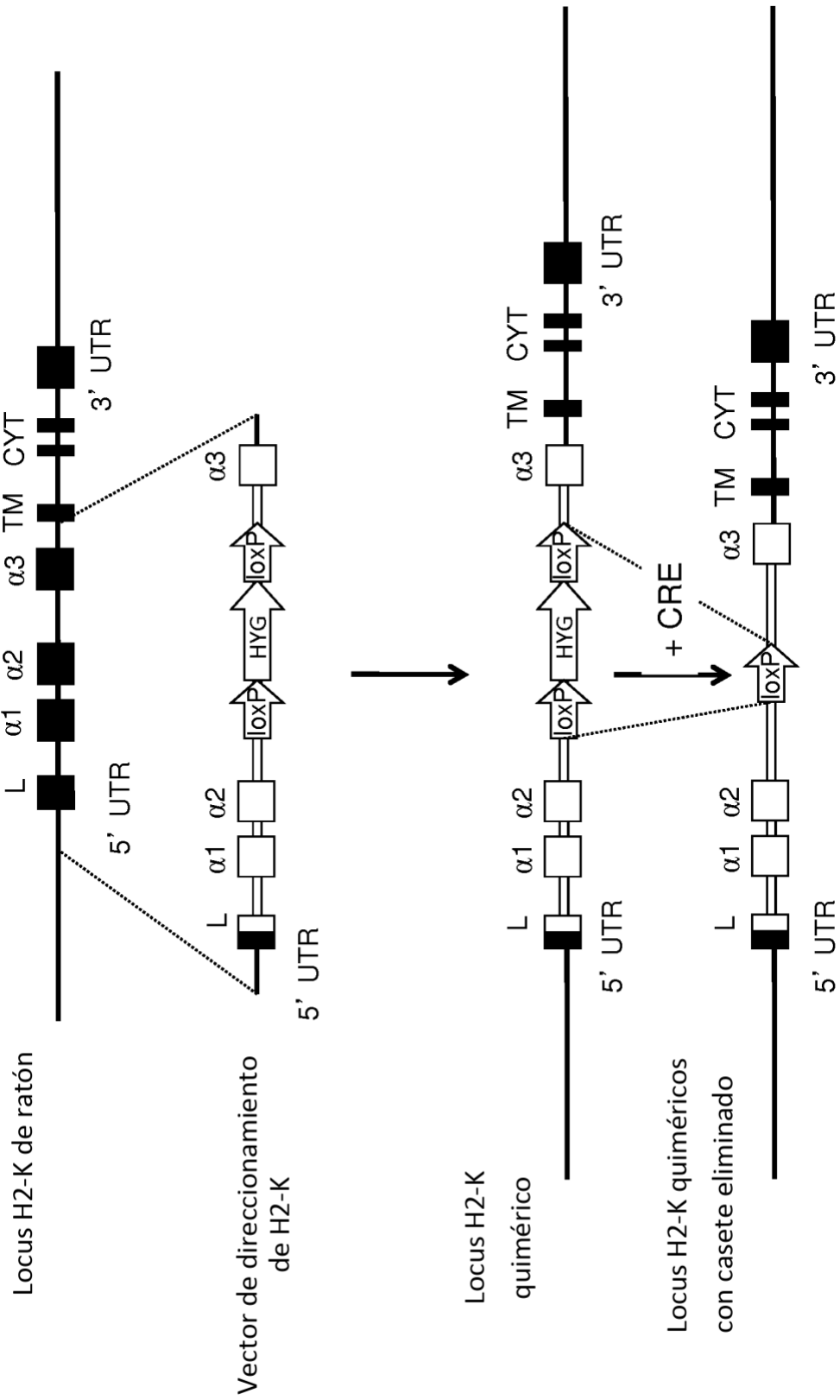


FIG. 5

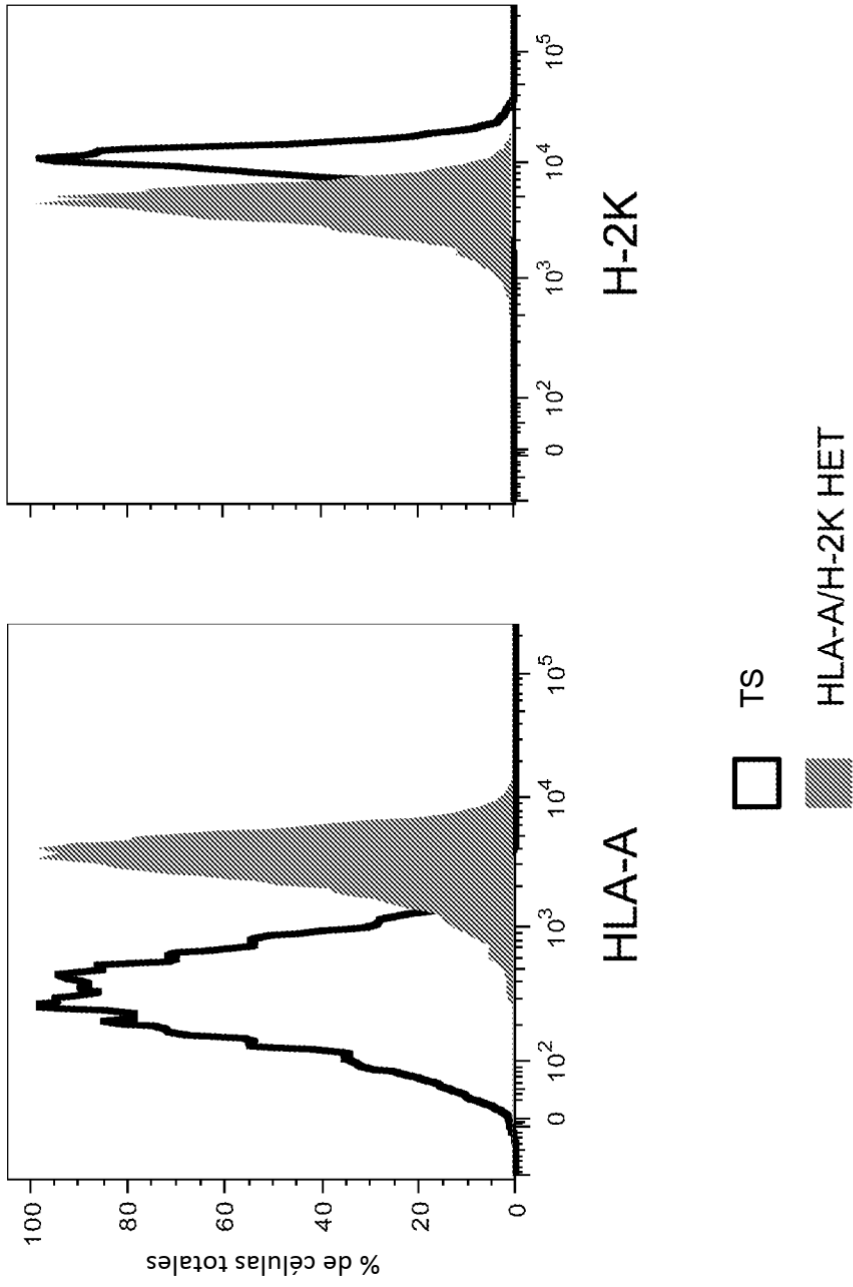


FIG. 6A

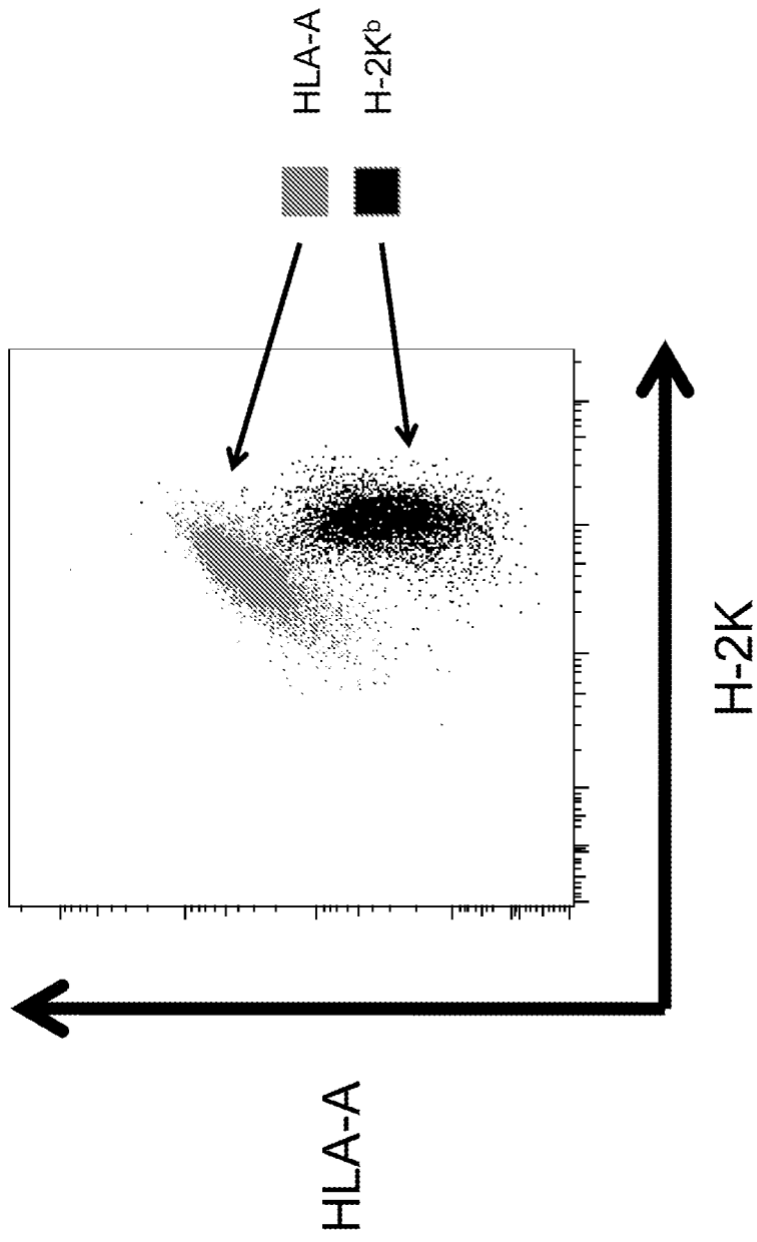


FIG. 6B

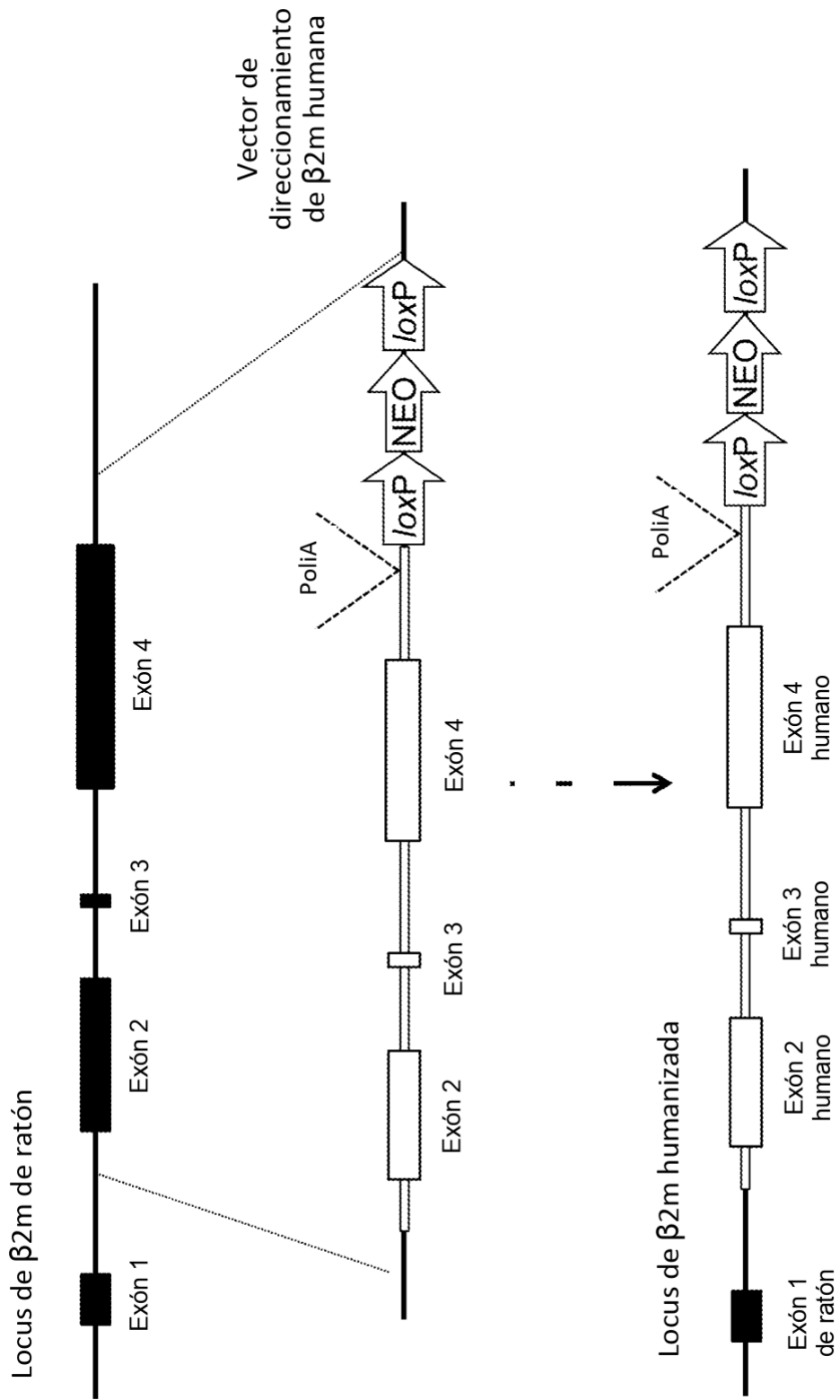


FIG. 7

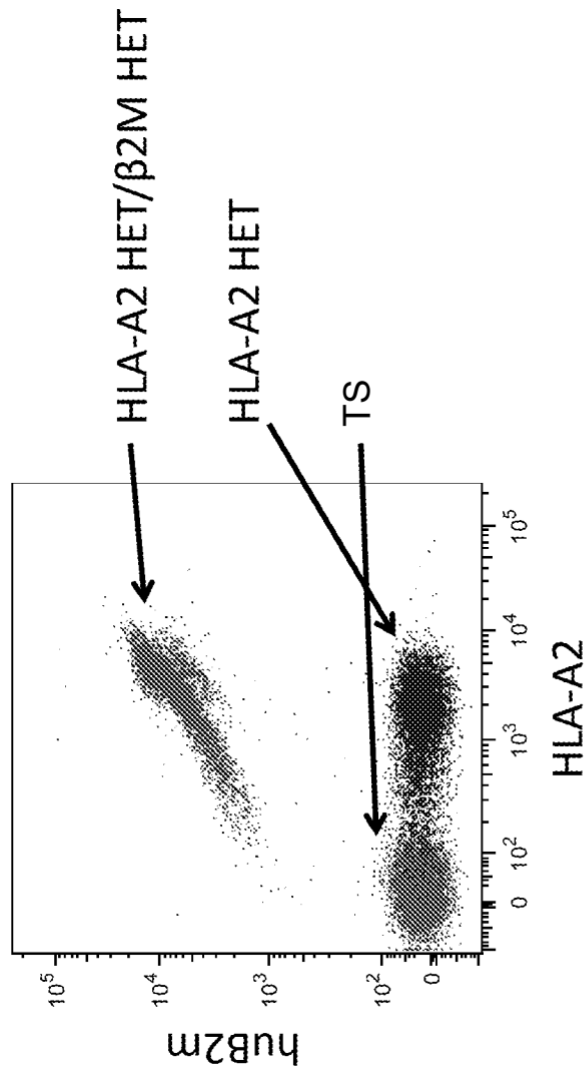


FIG. 8

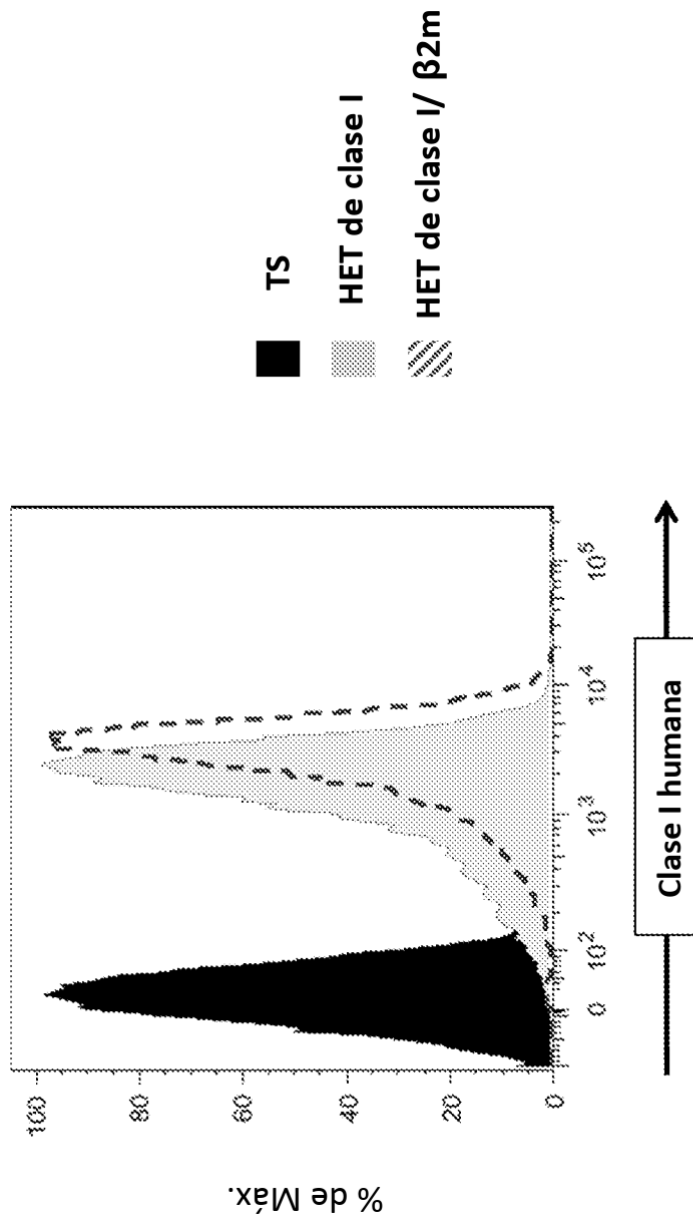


FIG. 9

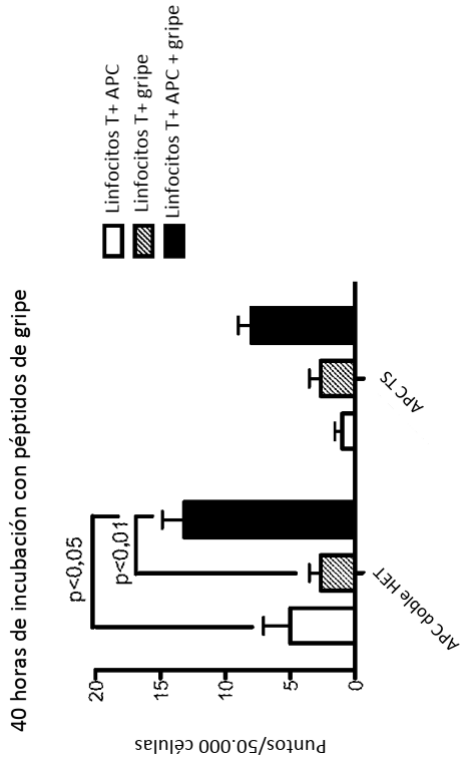
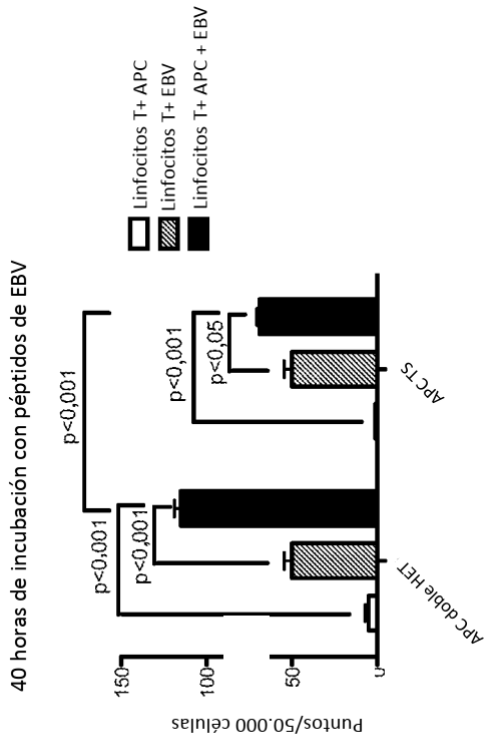


FIG. 10

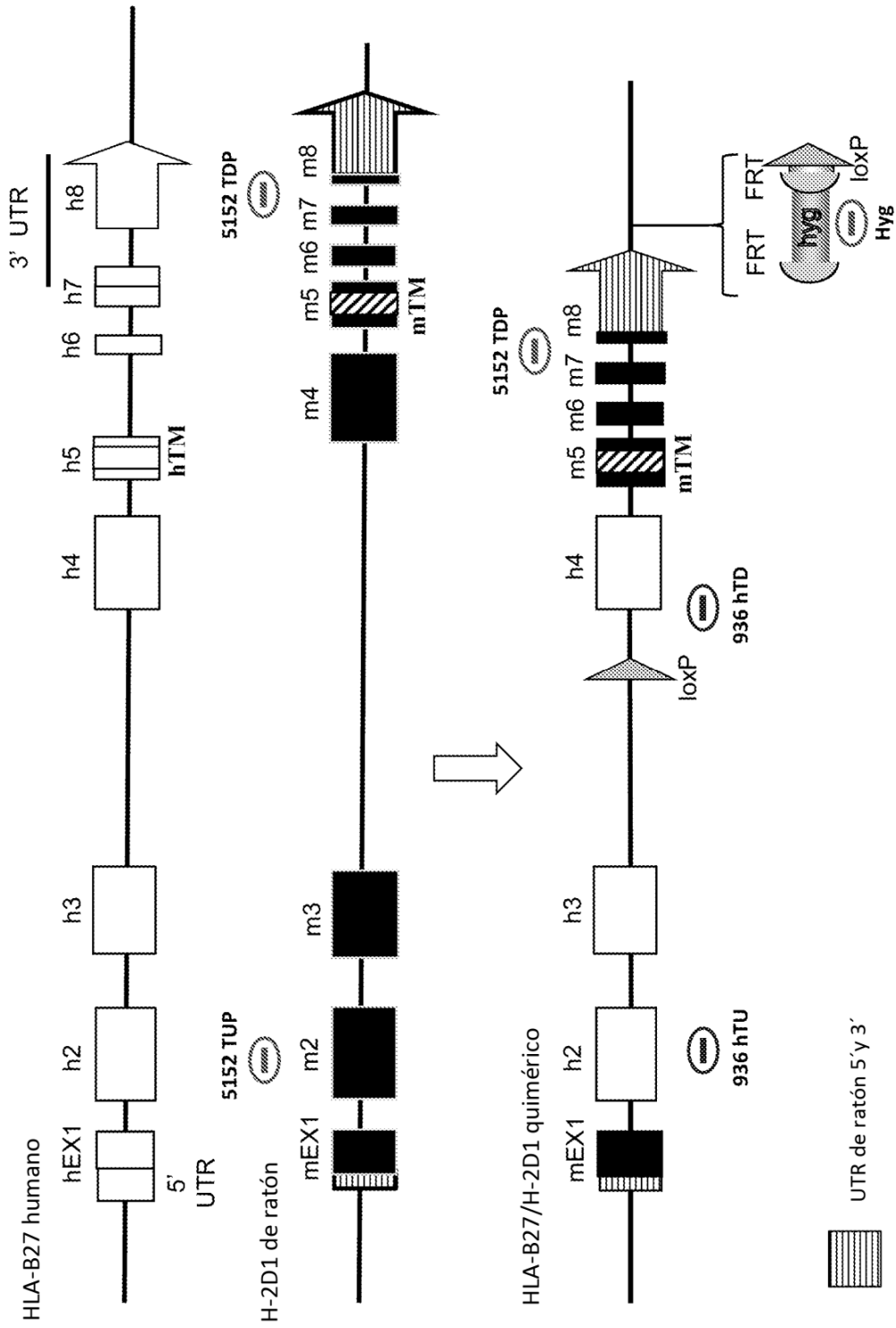


FIG. 11

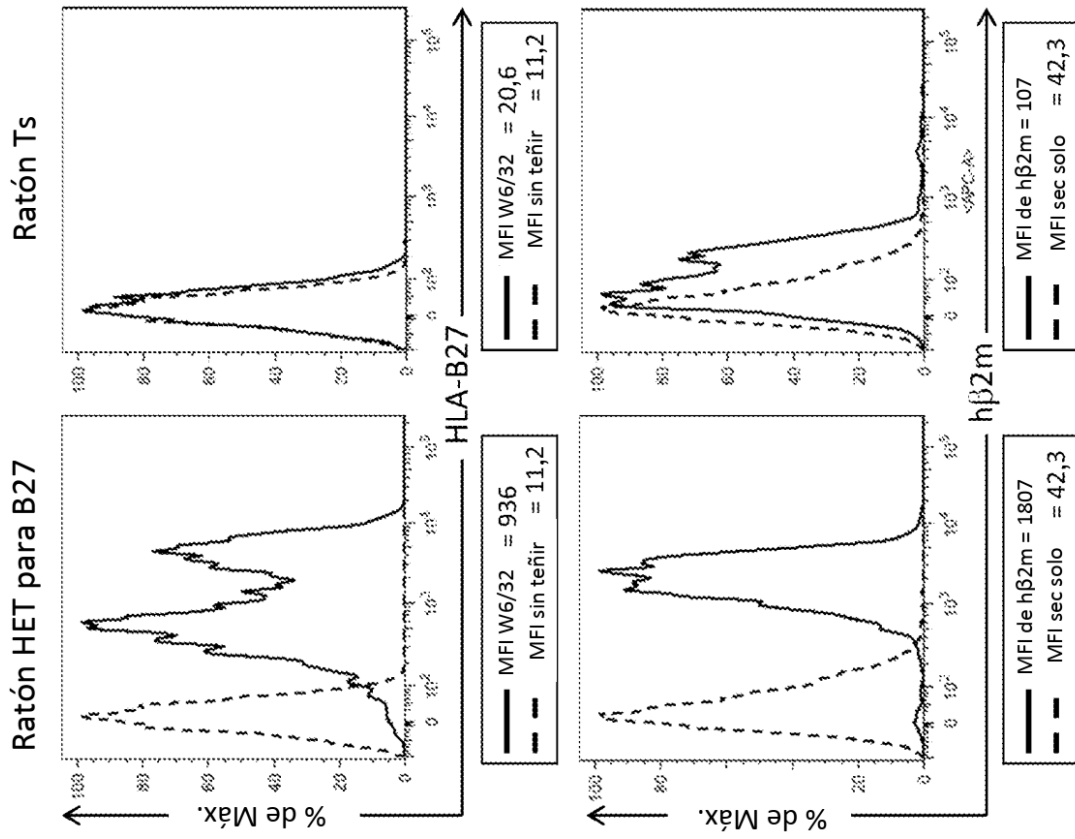


FIG. 12