

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 751**

51 Int. Cl.:

C07K 14/73 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 14/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2014** **E 18182319 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020** **EP 3421490**

54 Título: **Métodos para generar animales no humanos que expresan el complejo mayor de histocompatibilidad humanizado**

30 Prioridad:

22.02.2013 US 201361767811 P

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

14.12.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MACDONALD, LYNN;
MURPHY, ANDREW J.;
VORONINA, VERA y
GURER, CAGAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 798 751 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

Métodos para generar animales no humanos que expresan el complejo mayor de histocompatibilidad humanizado

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere a un animal no humano genéticamente modificado, por ejemplo, un roedor (por ejemplo, un ratón o una rata), que expresa moléculas de un complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) humano o humanizado de clase I y de un CMH humano o humanizado de clase II. La divulgación también se refiere a un animal no humano genéticamente modificado, por ejemplo, un ratón o una rata, que expresa una proteína de CMH I humano o humanizado (por ejemplo, cadena α de CMH I) y una proteína de CMH II humano o humanizado (por ejemplo, cadenas α CMH II y β CMH II) y que expresa adicionalmente una microglobulina $\beta 2$ humanizada; así como embriones, tejidos y células que expresan el mismo. La invención proporciona adicionalmente métodos para producir un animal no humano genéticamente humano que exprese tanto proteínas de CMH humano o humanizado de clase I y clase II y/o microglobulina $\beta 2$ según las reivindicaciones. Se desvelan en el presente documento métodos para identificar y evaluar péptidos en el contexto de un sistema inmune celular humanizado *in vitro* o en un animal no humano genéticamente modificado y métodos de modificar un locus de CMH de un animal no humano, por ejemplo, un ratón o una rata, para expresar proteínas de CMH I humano o humanizado y de CMH II humano o humanizado.

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 de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Las moléculas CMH se codifican por múltiples loci que se encuentra como una agrupación enlazada de genes que atraviesan aproximadamente 4 Mb. En ratones, los genes de CMH se encuentran en el cromosoma 17 y por razones históricas se denominan como los genes de histocompatibilidad 2 (H-2). En los 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 CMH (clase I, II y III) que muestran una organización similar en genomas humanos y murinos (véase FIG. 2 y FIG. 3, respectivamente).

Los loci de CMH 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 CMH 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 inmune.

Tanto los seres humanos como los ratones tienen genes de CMH de clase I (véase, FIG. 2 y FIG. 3). En los 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 una cadena pesada) y una cadena más pequeña denominada $\beta 2$ -microglobulina (también conocida como cadena ligera), que generalmente no es polimórfica (FIG. 1, izquierda). Estas dos cadenas forman un heterodímero no covalente sobre la superficie celular. La cadena α contiene tres dominios ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$). El exón 1 del gen de la cadena α codifica la secuencia líder, los exones 2 y 3 codifican los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, el exón 4 codifica el dominio $\alpha 3$, el exón 5 codifica el dominio transmembrana y los exones 6 y 7 codifican la cola citoplásmica. La cadena α forma una hendidura de unión a péptidos que implica los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (que se parecen a dominios tipo Ig) seguidos por el dominio $\alpha 3$, que es similar a la $\beta 2$ -microglobulina.

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

Las moléculas del CMH 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 mostrar fragmentos peptídicos (normalmente 8-10 aminoácidos de longitud) sobre la superficie de linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL). Los CTL están especializados en destruir cualquier célula que porte un péptido enlazado a CMH I reconocido por su propio TCR enlazado a membrana. Cuando una célula muestra péptidos derivados de proteínas celulares no presenta normalmente (por ejemplo, de origen vírico, tumoral o de otro origen no propio), tales péptidos se reconocen mediante los CTL, que se activan y destruyen la célula que muestra el péptido.

Tanto los seres humanos como los ratones tienen genes CMH de clase II (véase FIG. 2 y 3). En los seres humanos, los genes de CMH II clásicos se denominan HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR, mientras que en ratones son H-2A y H-2E

(a menudo abreviados como I-A e I-E, respectivamente). Proteínas adicionales codificadas por genes en el locus CMH II, HLA-DM y HLA-DO en seres humanos y H-2M y H-2O en ratones, no se encuentran sobre la superficie celular, sino que residen en el compartimento endocítico y aseguran una carga adecuada de las moléculas CMH II con péptidos. Las moléculas de clase II consisten en dos cadenas polipeptídicas: cadena α y cadena β . La porción extracelular de la cadena α contiene dos dominios extracelulares, $\alpha 1$ y $\alpha 2$; y la porción extracelular de la cadena β también contiene dos dominios extracelulares, $\beta 1$ y $\beta 2$ (véase FIG. 1, derecha). Las cadenas α y β están asociadas no covalentemente entre sí.

Las moléculas CMH de clase II se expresan sobre células presentadoras de antígeno (APC), por ejemplo, linfocitos B, macrófagos, células dendríticas, células endoteliales durante el transcurso de inflamación, etc. Las moléculas CMH II expresadas sobre la superficie de APC normalmente presentan antígenos generados en vesículas intracelulares con respecto a linfocitos T CD4+. Para participar en implicación de linfocitos T CD4+, el complejo CMH de clase II con el antígeno de interés debe ser lo suficientemente estable para sobrevivir lo suficiente para implicar un linfocito T CD4+. Cuando un linfocito T auxiliar CD4+ se involucra mediante un péptido extraño/complejo CMH II sobre la superficie de las APC, el linfocito T se activa para liberar citocinas que ayudan en la respuesta inmune con respecto al invasor.

No todos los antígenos provocarán la activación de linfocitos T debido a los mecanismos de tolerancia. Sin embargo, en algunas enfermedades (por ejemplo, cáncer, enfermedades autoinmunes) los péptidos derivados de algunas autoproteínas se convierten en la diana del componente celular del sistema inmune, lo que resulta en la destrucción de las células que presentan tales péptidos. Ha habido un gran avance en el reconocimiento de antígenos que son clínicamente significantes (por ejemplo, antígenos asociados con diversos tipos de cáncer). Sin embargo, para mejorar la identificación y selección de péptidos que provocarán una respuesta adecuada en un linfocito T humano, en particular, para péptidos de antígenos clínicamente significantes, permanece la necesidad de sistemas *in vivo* e *in vitro* que imiten aspectos del sistema inmune humano. Por lo tanto, existe la necesidad de sistemas biológicos (por ejemplo, células y animales no humanos genéticamente modificados) que pueden mostrar componentes de un sistema inmune humano.

Sumario de la invención

Se desvela un sistema biológico para generar o identificar péptidos que se asocian con proteínas de CMH de clase I humano y quimeras de las mismas y se unen a linfocitos T CD8+, así como péptidos que se asocian con proteínas de CMH de clase II humano y quimeras de las mismas y se unen a linfocitos T CD4+. Se desvelan animales no humanos que comprenden células no humanas que expresan moléculas humanizadas que funcionan en la respuesta inmune celular. También se desvelan los loci de roedores humanizados que codifican proteínas de CMH I y CMH II humanizados. También se desvelan células de roedores humanizados que expresan moléculas de CMH humanizado. Se desvelan sistemas *in vivo* e *in vitro* que comprenden células de roedores humanizadas, en las que las células de roedores expresan una o más moléculas del sistema inmune humanizadas.

En diversos ejemplos, en el presente documento se desvela un animal no humano que comprende en un locus de CMH endógeno una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CMH I humano/no humano, en el que una porción humana del polipéptido de CMH I quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido de CMH I humano; una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido α de CMH II humano/no humano quimérico, en el que una porción humana del polipéptido α de CMH II humano/no humano comprende un dominio extracelular de un polipéptido α de CMH II humano; y una tercera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido β de CMH II humano/no humano, en el que una porción humana del polipéptido β de CMH II humano/no humano quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido β de CMH II humano, en el que el animal no humano expresa proteínas de CMH I y CMH II humano/no humano quiméricas funcionales a partir de su locus CMH no humano endógeno. En un ejemplo, el animal no expresa polipéptidos de CMH I, II α y/o II β a partir del locus CMH no humano endógeno.

En un ejemplo, la primera secuencia de nucleótidos está situada en el locus CMH I no humano endógeno, la segunda secuencia de nucleótidos está situada en el locus CMH II α no humano endógeno y la tercera secuencia de nucleótidos está situada en el locus CMH II β no humano endógeno. En un ejemplo, la primera, segunda y/o tercera secuencia(s) de nucleótidos están unidas operativamente a elementos reguladores no humanos endógenos. En un ejemplo, la primera secuencia de nucleótidos está unida operativamente al promotor del CMH I no humano endógeno y elementos reguladores, la segunda secuencia de nucleótidos está unida operativamente al promotor de del CMH II α no humano endógeno y elementos reguladores y la tercera secuencia de nucleótidos está unida operativamente al promotor del CMH II β no humano endógeno y elementos reguladores.

En un ejemplo, la porción humana de un polipéptido de CMH I quimérico comprende dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del polipéptido de CMH I humano. En un ejemplo, una porción no humana del polipéptido de CMH I quimérico comprende dominios de transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido de CMH I no humano endógeno. El polipéptido de CMH I humano puede seleccionarse del grupo que consiste en HLA-A, HLA-B y HLA-C. En un ejemplo, el polipéptido de CMH I humano es HLA-A2. En otro ejemplo, el polipéptido de CMH I humano es HLA-A3, HLA-B7, HLA-B27, HLA-Cw6 o cualquier otra molécula de CMH I expresada en una población humana. En un

ejemplo adicional, un animal no humano desvelado en el presente documento comprende adicionalmente en su locus de $\beta 2$ microglobulina no humana endógena una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado, en el que el animal expresa el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado.

5 En un ejemplo, el dominio extracelular de CMH II α humano comprende dominios de CMH II $\alpha 1$ y $\alpha 2$ humanos. En otro ejemplo, el dominio extracelular de CMH II β humano comprende dominios de CMH II $\beta 1$ y $\beta 2$. En un ejemplo, la porción no humana de un polipéptido de CMH II α humano/no humano quimérico comprende dominios de transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido de CMH II α no humano endógeno. En un ejemplo, la porción no humana de un polipéptido de CMH II β humano/no humano quimérico comprende dominios de transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido de CMH II β no humano endógeno. En una realización, las porciones humanas de polipéptidos de CMH II α y β humano/ratón quiméricos se derivan de una proteína HLA de clase II humana seleccionada entre el grupo que consiste en HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. En un ejemplo específico, las porciones humanas de polipéptidos de CMH II α y β humanos/no humanos quiméricos se derivan de una proteína HLA-DR4 humana. Como alternativa, las porciones humanas de los polipéptidos de CMH II α y β humanos/no humanos quiméricos pueden derivarse de proteína de CMH II humana seleccionada entre HLA-DR2, HLA-DQ2.5, HLA-DQ8 o cualquier otra molécula de CMH II expresada en una población humana.

20 En algunos ejemplos, un animal proporcionado comprende dos copias del locus de CMH que contiene la primera, la segunda y la tercera secuencia de nucleótidos, mientras que en otros ejemplos, un animal proporcionado comprende una copia del locus de CMH que contiene la primera, la segunda y la tercera secuencia de nucleótidos. Por lo tanto, el animal puede ser homocigótico o heterocigótico para el locus de CMH que contiene secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de CMH I, CMH II α y CMH II β . En algunos ejemplos, el locus de CMH genéticamente modificado, que comprende secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de CMH I, CMH II α y CMH II β humanos/no humanos quiméricos descritos en el presente documento, se encuentra en la línea germinal del animal no humano.

30 Se desvela en el presente documento, un locus de CMH que comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CMH I humano/no humano quimérico, en el que una porción humana del polipéptido de CMH I quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido de CMH I humano; una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido α de CMH II humano/no humano quimérico, en el que una porción humana del polipéptido α de CMH II humano/no humano comprende un dominio extracelular de un polipéptido α de CMH II humano; y una tercera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido β de CMH II humano/no humano, en el que una porción humana del polipéptido β de CMH II humano/no humano quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido β de CMH II humano. En algunos ejemplos, las porciones no humanas de los polipéptidos de CMH I, II α y II β comprenden dominios de transmembrana y citoplásmicos de CMH I, II α y II β no humano, respectivamente.

40 En un ejemplo, el animal no humano genéticamente modificado es un roedor. En un ejemplo, el roedor es una rata o un ratón. En un ejemplo, el roedor es un ratón. Por lo tanto, en un ejemplo, la primera secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido de CMH I de humano/ratón quimérico y la porción de ratón del polipéptido de CMH I deriva de H-2K, H-2D o H-2L. En un ejemplo específico, la porción de ratón del polipéptido de CMH I quimérico deriva de H-2K. En un aspecto, la segunda secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido α de CMH II humano/ratón, la tercera secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido β de CMH II de humano/ratón quimérico y las porciones de los polipéptidos α y β de CMH II derivan de H-2E o H-2A. En un ejemplo específico, las porciones de ratón de los polipéptidos de CMH II quiméricos derivan de H-2E.

50 Por lo tanto, también se desvela en el presente documento un ratón genéticamente modificado que comprende en un locus de CMH endógeno una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CMH I de humano/ratón quimérico, en el que la porción humana del polipéptido de CMH I quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido de CMH I humano; una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido α de CMH II humano/ratón, en el que la porción humana del polipéptido α de CMH II humano/no humano comprende un dominio extracelular de un polipéptido α de CMH II humano; una tercera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido β de CMH II de humano/ratón, en el que la porción humana del polipéptido β de CMH II humano/no humano quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido β de CMH II humano; en el que el ratón expresa proteínas de CMH I y CMH II de humano/ratón quiméricas funcionales a partir de su locus CMH de ratón endógeno. En un ejemplo específico, la primera secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido de HLA-A2/H-2K quimérico, la segunda secuencia de nucleótidos codifica una cadena α de un polipéptido de HLA-DR4/H-2E quimérico y la tercera secuencia de nucleótidos codifica una cadena β de un polipéptido de HLA-DR4/H-2E quimérico y el ratón expresa proteínas funcionales de HLA-A2/H-2K y HLA-DR4/H-2E. En un ejemplo adicional, el ratón comprende adicionalmente en un locus de $\beta 2$ microglobulina endógena una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado. En un ejemplo, el ratón no expresa polipéptidos de CMH endógenos funcionales a partir de su locus de CMH endógeno.

65 También se proporcionan en el presente documento métodos para generar un animal no humano genéticamente modificados (por ejemplo, roedor, por ejemplo, ratón o rata) según las reivindicaciones. Por lo tanto, se desvela en el

presente documento un método para generar un animal no humano genéticamente modificado que comprende reemplazar en un locus de CMH II no humano endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un complejo de CMH II no humano con una secuencia de nucleótidos que codifica un complejo de CMH II humano/no humano quimérico para generar un primer animal no humano; y reemplazar en un locus de CMH I no humano endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CMH I no humano con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CMH I humano/no humano quimérico para generar un segundo animal no humano. En un ejemplo, las etapas de reemplazar secuencias de nucleótidos comprenden la recombinación homóloga en células ES no humanas y el segundo animal no humano se genera mediante recombinación homóloga en células ES que portan secuencias de nucleótidos que codifican complejo de CMH II humano/no humano quimérico. El complejo de CMH II quimérico comprende polipéptidos α y β de CMH II humanos/no humanos quiméricos.

Se desvela en el presente documento un método para generar un animal no humano genéticamente modificado que comprende reemplazar en un locus de CMH I no humano endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CMH I no humano con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CMH I humano/no humano quimérico para generar un primer animal no humano; y reemplazar en un locus de CMH II no humano endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un complejo de CMH II no humano con una secuencia de nucleótidos que codifica un complejo de CMH II humano/no humano quimérico para generar un segundo animal no humano. En un ejemplo, las etapas de reemplazar secuencias de nucleótidos comprenden la recombinación homóloga en células ES no humanas y el segundo animal no humano se genera mediante recombinación homóloga en células ES que portan una secuencia de nucleótidos que codifican polipéptido de CMH I humano/no humano quimérico.

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

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 técnica a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada. La siguiente descripción detallada incluye representaciones ilustrativas de las diversas realizaciones de la invención, que no son restrictivas de la invención como se reivindica. Las figuras acompañantes constituyen una porción de esta memoria descriptiva y, junto con la descripción, sirven únicamente para ilustrar las realizaciones y no limitar la invención.

35 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un dibujo esquemático de moléculas del CMH de clase I (panel izquierdo) y CMH de clase II (panel derecho) expresadas sobre la superficie de una célula. Los círculos grises representan péptidos unidos en las hendiduras de unión a péptidos.

La FIG. 2 es una representación esquemática (no a escala) de la estructura genómica 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 del CMH de ratón, que muestra genes de clase I, II y III.

La FIG. 4 ilustra la estrategia para generar un locus de CMH humanizado que comprende genes de CMH I y CMH II humanizados. En el ejemplo particular ilustrado, el locus de CMH del ratón generado comprende secuencias de HLA-A2 y HLA-DR4 humanas ($H2-K^{+/1666}$ MHC-II $^{+/1681}$). Los vectores directores grandes introducidos en células ES en cada etapa de la humanización se ilustran a la derecha de las flechas.

La FIG. 5 (A-D) es una ilustración esquemática (no a escala) de la estrategia para generar un vector dirigido que comprende I-E β e I-E α humanizado (es decir, quimera de H-2E β /HLA-DR β 1*04 y H-2E α /HLA-DR α *01, respectivamente). En la FIG. 5C., la secuencia de CMH II humanizado final de la FIG. 5B se liga entre los sitios de restricción PI-SceI e I-CeuI de la construcción final de la FIG. 5A, para generar una construcción que comprende CMH II humanizado y exón 1 de I-E α a partir de BALB/c. Pg=pseudogén; BHR= recombinación homóloga bacteriana; CM=cloranfenicol; spec=espectinomicina; hyg=higromicina; neo=neomicina; EP=electroporación. Los triángulos representan exones, los triángulos rellenos representan exones de ratón a partir de ratón C57BL/6 (con la excepción de los triángulos discontinuos, que representan el exón 1 de I-E α de ratón BALB/c) y los triángulos transparentes representan exones humanos.

La FIG. 6 muestra una ilustración esquemática, no a escala, de genes I-E e I-A de CMH de clase II, que muestran la desactivación del locus de ratón usando un casete de higromicina, seguido por la introducción de un vector que comprende I-E β e I-E α humanizado (es decir, quimera de H-2E β /HLA-DR β 1*04 and H-2E α /HLA-DR α *01, respectivamente). los triángulos transparentes representan exones humanos; los triángulos rellenos representan exones de ratón. Las sondas usadas para el genotipado están rodeadas con un círculo.

La FIG. 7 muestra una ilustración esquemática, no a escala, de la retirada mediada por Cre del casete de neomicina de la FIG. 6. los triángulos transparentes representan exones humanos; los triángulos rellenos representan exones de ratón. Las dos tiras superiores representan loci de CMH II en ratón heterocigótico de CMH II humanizado que alberca un casete de selección de neomicina y las dos tiras inferiores representan loci de CMH II en ratón heterocigótico de CMH II con casete de neomicina retirado.

La FIG. 8 es un diagrama esquemático (no a escala) de la estrategia dirigida usada para fabricar un locus de H-2K quimérico que expresa una región extracelular de una proteína de 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=domina citoplásmico, HYG=higromicina.

La FIG. 9 es un gráfico de puntos de la expresión *in vivo* de HLA-A2 y HLA-DR4 en ratones heterocigóticos que albergan loci de HLA-A2/H-2K y HLA-DR4/H-2E quiméricos. La expresión de HLA-DR4 de estado estable fue baja pero presente; esta baja expresión se esperaba y la expresión se regula positivamente cuando se activa.

Descripción detallada de realizaciones de la invención

Definiciones

En el presente documento se desvelan animales no humanos genéticamente modificados (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, etc.) que expresan tanto proteínas de CMH I como CMH II humano o humanizado; embriones, células y tejidos que comprenden el mismo; métodos para producir el mismo; así como métodos de uso del mismo. Salvo que se defina de otro modo, todos los términos y frases utilizadas en el presente documento incluyen que los términos y las frases que son habituales 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 "conservativo", cuando se usa para describir una sustitución conservativa de aminoácido, incluye la sustitución de un resto de aminoácido por otro resto de aminoácido que tiene un grupo R de la cadena secundaria 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 CMH I o el CMH II en presentar un péptido de interés. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas secundarias con propiedades químicas similares incluyen cadenas secundarias 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 secundarias básicas tales como lisina, arginina e histidina; cadenas secundarias ácidas tales como ácido aspártico y ácido glutámico; y, cadenas secundarias que contienen azufre tales como cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservativos 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 nativo en una proteína con alanina, como se usa en, por ejemplo, mutagénesis de 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 la que la sustitución tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica de PAM250.

Por lo tanto, también se desvela en el presente documento un animal no humano genéticamente modificado cuyo genoma comprende una secuencia de nucleótidos que codifica polipéptidos de CMH I y II humano o humanizado, en el que el polipéptido de CMH I o CMH II comprende sustituciones de aminoácidos conservativas en la secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento.

Un experto en la materia entenderá que, además de los restos de ácido nucleico que codifican un polipéptido de CMH I o CMH II humano o humanizado descritos en el presente documento debido a la degeneración del código genético, otros ácidos nucleicos pueden codificar el polipéptido desvelado en el presente documento. Por lo tanto, además de un animal no humano genéticamente modificado que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica polipéptidos de CMH I y CMH II con sustituciones de aminoácidos conservativas, también se desvela un animal no humano cuyo genoma comprende una secuencia 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 un alineamiento ClustalW v. 1.83 (lento) 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 humana/no humana quimérica con una secuencia humana, la porción humana de la secuencia humana/no humana quimérica (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 humana/no humana quimérica (por ejemplo, comparando un ectodominio humano de una proteína

humana/de ratón quimérica 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 el alineamiento y la comparación óptimos, son idénticos en al menos aproximadamente 75 % de nucleótidos o aminoácidos, por ejemplo, al menos aproximadamente 80 % de nucleótidos o aminoácidos, por ejemplo, al menos aproximadamente 90-95 % de nucleótidos o aminoácidos, por ejemplo, más de 97 % de nucleótidos o aminoácidos. Un experto en la materia entenderá que, para el direccionamiento óptimo del gen, la construcción directora 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.

El término "unido operativamente" 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 de ácido nucleico que codifica una proteína puede unirse operativamente a secuencias reguladoras (por ejemplo, promotoras, potenciadoras, secuencia silenciadora, etc.) con el fin de retener la regulación de la transcripción adecuada. Además, varias porciones de la proteína quimérica o humanizada desvelada en el presente documento pueden unirse operativamente para retener el plegado, procesamiento, dirección, expresión adecuados y otras propiedades funcionales de la proteína en la célula. A menos que se indique otra cosa, varios dominios de la proteína quimérica o humanizada desvelada en el presente documento se unen operativamente entre sí.

La expresión "complejo CMH I" o similar, como se usa en el presente documento, incluye el complejo entre el polipéptido de cadena α de CMH I y el polipéptido de β 2-microglobulina. La expresión "polipéptido de CMH I" o similar, como se usa en el presente documento, incluye el polipéptido de cadena α de CMH I solo. Las expresiones "complejo de CMH II", "proteína de CMH II", o similares, como se usa en el presente documento, incluyen el complejo entre un polipéptido α de CMH II y un polipéptido β de CMH II. La expresión "polipéptido α de CMH II" o "polipéptido de β de CMH" (o similares), como se usa en el presente documento, incluye el polipéptido α de CMH II solo o el polipéptido β de CMH II solo, respectivamente. De forma análoga, los términos "complejo HLA-DR4", "proteína HLA-DR4", "complejo H-2E", "proteína H-2E, o similares, se refieren a un complejo entre polipéptidos α y β . Normalmente, los términos "CMH humano" y "HLA" se usan de manera intercambiable.

El término "sustitución", en referencia a la sustitución de genes se refiere a colocar material genético exógeno en un locus genético endógeno, sustituyendo por tanto todo o una porción del gen endógeno con una secuencia de ácido nucleico ortóloga u homóloga. Como se demuestra en los Ejemplos siguientes, la secuencia de ácido nucleico de locus de CMH endógeno se sustituyó por una secuencia de nucleótidos que comprende secuencias que codifican una porción de polipéptido de CMH I humano, específicamente, que codifica la porción extracelular del polipéptido de CMH I; así como porciones de polipéptidos α y β de CMH II humano, específicamente, que codifica las porciones extracelulares de los polipéptidos α y β de CMH II.

"Funcional" como se usa en el presente documento, por ejemplo, en referencia a un polipéptido funcional, se refiere a un polipéptido que retiene al menos una actividad biológica normalmente asociada con la proteína nativa. Por ejemplo, en algunos ejemplos, una sustitución en un locus endógeno (por ejemplo, la sustitución un locus de CMH no humano endógeno) da como resultado un locus que fracasa en expresar un polipéptido endógeno funcional, por ejemplo, polipeptido de CMH I o CMH II. Asimismo, la expresión "funcional" como se usa en el presente documento en referencia al dominio extracelular de una proteína, se refiere a un dominio extracelular que retiene su funcionalidad, por ejemplo, en el caso del CMH I o CMH II, la capacidad de unir un antígeno, la capacidad de unir un co-receptor de linfocitos T, etc. En algunos ejemplos una sustitución en el locus de CMH endógeno da como resultado un locus que fracasa en expresar un dominio extracelular (por ejemplo, un dominio extracelular funcional) de un CMH endógeno mientras que expresa un dominio extracelular (por ejemplo, un dominio extracelular funcional) de un CMH humano.

Animales CMH genéticamente modificados

Se desvelan en el presente documento animales no humanos genéticamente modificados que comprenden en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica polipéptidos de CMH I y CMH II humano o humanizado; por lo tanto, los animales expresan polipéptidos de CMH I como CMH II humano o humanizado.

Los genes de CMH 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 CMH de humano y de ratón se presenta en las FIG. 2 y 3, respectivamente. Los genes de CMH se encuentran entre los genes más polimórficos de los genomas de ratón y de humano. Se supone que los polimorfismos de CMH son importantes en la prestación de una ventaja evolutiva; 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 de CMH de clase I comprende un dominio extracelular (que comprende tres dominios: α_1 , α_2 , y α_3), un dominio transmembrana y una cola citoplásmica. Los dominios α_1 y α_2 forman la hendidura de unión a péptidos,

mientras que el α_3 interactúa con la β_2 -microglobulina.

Además a su interacción con la β_2 -microglobulina, el dominio α_3 interactúa con el co-receptor de TCR CD8, facilitando la activación específica a antígeno. Aunque la unión del CMH de clase I al CD8 es de aproximadamente 5 100 veces más débil que la unión del TCR al CMH de clase I, la unión de CD8 mejora la afinidad de la unión de TCR. Wooldridge y col. (2010) MHC Class I Molecules with Superenhanced CD8 Binding Properties Bypass the Requirement for Cognate TCR Recognition and Nonspecifically Activate CTLs, *J. Immunol.* 184:3357-3366. Curiosamente, aumentar la unión del CMH de clase I a CD8 abrogó la especificidad de antígeno en la activación de CTL. *Id.*

10 La unión de CD8 a moléculas de CMH de clase I es específico a 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 y col. (1988) The Lyt-2 Molecule Recognizes Residues in the Class I α_3 Domain in Allogeneic Cytotoxic T Cell Responses, *J. Exp. Med.* 168:325-341. La unión diferencial se debió seguramente a determinantes similares de CDR (tipo CDR1 y CDR2) sobre CD8 que no se había conservado entre humanos y ratones. Sanders y col. (1991) Mutations in CD8 that Affect Interactions with HLA Class I and Monoclonal Anti-CD8 Antibodies, *J. Exp. Med.* 174: 371-379; Vitiello y col. (1991) Analysis of the HLA-restricted Influenza-specific Cytotoxic T Lymphocyte Response in Transgenic Mice Carrying a Chimeric Human-Mouse Class I Major Histocompatibility Complex, *J. Exp. Med.* 173: 1007-1015; y, Gao y col. (1997) Crystal structure of the complex between human CD8 $\alpha\alpha$ and HLA-A2, *Nature* 387:630-634. Se ha dado a conocer que el 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 y col. (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 mutante de H-2D^d no se sometieron a lisis por los linfocitos T de CD8+. Potter y col. (1989) Substitution at residue 227 of H-2 class I molecules abrogates recognition by CD8-dependent, but not CD8-independent, cytotoxic T lymphocytes, *Nature* 337:73-75.

30 Por lo tanto, debido a la especificidad a especies de la interacción entre el dominio α_3 de CMH de clase I y CD8, un complejo CMH I que comprende una sustitución de un dominio α_3 H-2K con un dominio α_3 HLA-A2 α humano no fue funcional en un ratón (es decir, *in vivo*) en la ausencia de un CD8 humano. En animales transgénicos para HLA-A2, la sustitución del dominio α_3 humano para el dominio α_3 de ratón resultó en la restauración de la respuesta de linfocitos T. Irwin y col. (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 y col. (1991), anteriormente citado.

35 El dominio transmembrana y la cola citoplásmica de proteínas de CMH de clase I de ratón también tiene importantes funciones. Una función del dominio transmembrana de CMH I es facilitar la modulación por HLA-A2 de la adhesión de células homotípicas (para potenciar o inhibir la adhesión), seguramente como resultado de la reticulación (o ligadura) de moléculas de CMH de superficie. Wagner y col. (1994) Ligation of MHC Class I and Class II Molecules Can Lead to Heterologous Desensitization of Signal Transduction Pathways That Regulate Homotypic Adhesion in Human Lymphocytes, *J. Immunol.* 152:5275-5287. La adhesión celular puede afectarse mediante mAbs que une en diversos epítomos de la molécula HLA-A2, sugirieron que existen múltiples sitios sobre el HLA-A2 implicado en la modulación de la adhesión de células homotípicas; dependiendo del epítomo enlazado, el efecto puede ser potenciar o inhibir la adhesión dependiente de HLA-A2. *Id.*

45 La cola citoplásmica, codificada por los exones 6 y 7 del gen CMH I, es supuestamente necesario para la expresión adecuada sobre la superficie celular y para la inhibición mediada por LIR1 de citotoxicidad celular de NK. Gruda y col. (2007) Intracellular Cysteine Residues in the Tail of MHC Class I Proteins Are Crucial for Extracellular Recognition by Leukocyte Ig-Like Receptor 1, *J. Immunol.* 179:3655-3661. Se requiere una cola citoplásmica para la multimerización de al menos algunas moléculas de CMH I mediante la formación de enlaces de disulfuro sobre sus restos de cisteína y, por de este modo, puede jugar un papel en la agrupación y reconocimiento por las células NK. Lynch y col. (2009) Novel MHC Class I Structures on Exosomes, *J. Immunol.* 183:1884-1891.

55 El dominio citoplásmico de HLA-A2 contiene un resto de serina constitutivamente fosforilado y una tirosina fosforilable, aunque -en células Jurkat- moléculas de HLA-A2 mutantes que carecen de un dominio citoplásmico parecen normales en cuanto a expresión, asociación citoesquelética, agregación e internalización endocítica. Gur y col. (1997) Structural Analysis of Class I MHC Molecules: The Cytoplasmic Domain Is Not Required for Cytoskeletal Association, Aggregation, and Internalization, *Mol. Immunol.* 34(2): 125-132. Las moléculas HLA-A2 truncada que carecen del dominio citoplásmico son aparentemente expresadas de forma normal y se asocian con la β_2 microglobulina. *Id.*

60 Sin embargo, varios estudios han demostrado que la cola citoplásmica es crítica en el trans migración intracelular, presentación de antígenos mediada por células dendríticas (DC) y sensibilización de CTL. Un resto de tirosina codificado por el exón 6 mostró requerirse para la trans migración de CMH I a través de compartimentos endosómicos, la presentación de antígenos exógenos y sensibilización de CTL; mientras que la eliminación del exón 7 causó la mejora de las respuestas de CTL antivíricas. Lizee y col. (2003) Control of Dendritic Cross-Presentation

by the Major Histocompatibility Complex Class I Cytoplasmic Domain, *Nature Immunol.* 4: 1065-73; Basha y col. (2008) MHC Class I Endosomal and Lysosomal Trafficking Coincides with Exogenous Antigen Loading in Dendritic Cells, *PLoS ONE* 3: e3247; y Rodríguez-Cruz y col. (2011) Natural Splice Variant of MHC Class I Cytoplasmic Tail Enhances Dendritic Cell-Induced CD8+ T-Cell Responses and Boosts Anti-Tumor Immunity, *PLoS ONE* 6:e22939.

5 El complejo de CMH de clase II comprende dos dominios no covalentemente asociados: una cadena α y una cadena β , también referidas en el presente documento como un polipéptido α y un polipéptido β (FIG. 1, derecha). La proteína atraviesa la membrana plasmática; de este modo, contiene un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico. La porción extracelular de la cadena α incluye dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y la
10 porción extracelular de la cadena β incluye dominios $\beta 1$ y $\beta 2$. Los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ forman una hendidura de unión a péptidos sobre la superficie celular. Debido a la conformación tridimensional de la hendidura de unión a péptidos del complejo CMH II, no hay teóricamente un límite superior sobre la longitud del antígeno enlazado, pero normalmente los péptidos presentados por CMH II tienen una longitud de entre 13 y 17 aminoácidos.

15 Además a su interacción con los péptidos antigénicos, la hendidura de unión a péptidos de la moléculas de CMH II interactúa con la cadena invariante (Ii) durante el proceso de formación del complejo CMH II y la adquisición de péptidos. Los dímeros de CMH II α/β se reúnen en el retículo endoplásmico y se asocian con la cadena Ii, que es la responsable del control de la unión de péptidos y dirección del CMH II en la trayectoria endocítica. En el endosoma, Ii se somete a proteólisis y un pequeño fragmento de Ii, péptido de cadena invariante asociada a Clase II (CLIP),
20 permanece en la hendidura de unión a péptidos. En el endosoma, con el control de HLA-DM (en humanos), el CLIP se intercambia por péptidos antigénicos.

El CMH II interactúa con el co-receptor de linfocitos T CD4 en la grieta hidrófoba en el punto de unión entre los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$. Wang and Reinherz (2002) Structural Basis of T Cell Recognition of Peptides Bound to MHC
25 Molecules, *Molecular Immunology*, 38:1039-49. Cuando CD4 y el receptor de linfocitos T unen la misma molécula de CMH II complejada con un péptido, la sensibilidad de un linfocito T a un antígeno se aumenta y requiere 100 veces menos de antígeno para su activación. Véase, Janeway's Immunobiology, 7ª Ed., Murphy et al. eds., Garland Science, 2008.

30 Se han propuesto numerosas funciones para los dominios transmembrana y citoplásmica de CMH II. En el caso del dominio citoplásmico, se ha demostrado ser importante para la señalización intracelular, la trans migración a la membrana plasmática y, finalmente, la presentación de antígenos. Por ejemplo, se mostró que los hibridomas de linfocitos T responden pobremente a células presentadoras de antígeno (APC) transfectadas con cadenas β de CMH II truncadas en el dominio citoplásmico y la inducción de la diferenciación de linfocitos B se ve imposibilitada. Véase,
35 por ejemplo, Smiley y col. (1996) Truncation of the class II β -chain cytoplasmic domain influences the level of class II/invariant chain-derived peptide complexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:241-44. La truncación de moléculas de clase II parece alterar la producción de cAMP. Se ha postulado que la delección de la cola citoplásmica de CMH II afecta la trans migración intracelular, previniendo, de este modo, que el complejo atraviese antígenos relevantes en la trayectoria endocítica. Smiley y col. (*anteriormente citado*) demostraron que el truncamiento de moléculas de clase II en el dominio citoplásmico reduce el número de complejos CLIP/clase II, postulando que esto afecta a la
40 capacidad de CLIP de regular eficazmente la presentación del antígeno.

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

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

105:3491-96.

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

En el presente documento se desvela un animal no humano modificado genéticamente, por ejemplo, roedor (por ejemplo, ratón o rata) que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CMH I humano o humanizado y una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína CMH II humano o humanizado. La secuencia de nucleótidos CMH I puede codificar un polipéptido CMH I que es parcialmente humano y parcialmente de no humano, por ejemplo, un polipéptido CMH I quimérico de humano/no humano y la secuencia de nucleótidos puede codificar una proteína CMH II que es parcialmente humano y parcialmente no humano, por ejemplo, proteína CMH II quimérica humano o no humano (por ejemplo, que comprende polipéptidos α y β CMH II quiméricos humano/no humano). En algunos ejemplos, el animal no expresa polipéptidos CMH I y II endógenos, por ejemplo, polipéptidos CMH I y II endógenos funcionales.

Un animal no humano genéticamente modificado que comprende en su genoma, por ejemplo, en el locus endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CMH I quimérico humano/no humano se desvela en las Solicitudes de Patente de los EE.UU. n.º 13/661.159 y 13/793.812. Un animal no humano genéticamente modificado que comprende en su genoma, por ejemplo, en el locus endógeno, una secuencia de nucleótidos que codifica polipéptidos humanizados, por ejemplo, CMH II quiméricos humanos/no humanos se desvela en la Solicitud de Patente de los EE.UU. n.º 13/661, 116 y 13/793 935. Se desvela en el presente documento un animal no humano genéticamente modificado que comprende en su locus CMH endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido CMH I quimérico humano/no humano y polipéptidos CMH II quiméricos humanos/no humanos. Resultaría complicado generar tal animal mediante simple reproducción de los animales de CMH I y CMH II humanizados debido al próximo enlace de los genes CMH I y CMH II en el cromosoma 17 de ratón y cromosoma 6 humano. Por lo tanto, la presente solicitud también proporciona un método novedoso para generar animales no humanos genéticamente modificados que comprenden secuencias que codifican polipéptidos CMH I y CMH I humano o humanizado, por ejemplo, animales en cuyas secuencias que codifican polipéptidos de CMH I y II endógeno se sustituyen por las que codifican polipéptidos de CMH I y II quiméricos humano/no humano.

De este modo, se desvelan en el presente documento un animal no humano genéticamente modificado que comprende en su genoma, por ejemplo, un locus CMH endógeno, una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido α de CMH I humano/no humano quimérico, en el que una porción humana del polipéptido de CMH I quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido de CMH I humano; una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido α de CMH II humano/no humano quimérico, en el que una porción humana del polipéptido α de CMH II quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido α de CMH II humano; y una tercera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido β de CMH II humano/no humano, en el que una porción humana del polipéptido β de CMH II quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido β de CMH II humano; en el que el animal no humano expresa proteínas de CMH I y CMH II humano/no humano quiméricas funcionales a partir de su locus CMH no humano endógeno. En un ejemplo, la primera, segunda y/o tercera secuencia de nucleótidos está situada en el locus CMH no humano endógeno. En un ejemplo, en donde el mamífero no humano es un ratón, la primera, segunda y/o tercera secuencia de nucleótidos está situada en el locus CMH de ratón endógeno en el cromosoma 17 de ratón. En un ejemplo, la primera secuencia de nucleótidos está situada en el locus CMH I no humano endógeno. En un ejemplo, la segunda secuencia de nucleótidos está situada en el locus α de CMH II no humano endógeno. En un ejemplo, la tercera secuencia de nucleótidos está situada en el locus β CMH II no humano endógeno.

En un ejemplo, el animal no humano solo expresa polipéptidos CMH I quiméricos humano/no humano, α CMH II y/o β CMH II y no expresa polipéptidos CMH no humano endógeno (por ejemplo, polipéptidos de CMH I, α CMH II y/o β CMH II endógenos funcionales a partir del locus CMH no humano endógeno. En un ejemplo, el animal que se describe en el presente documento expresa un CMH I quimérico funcional y un CMH II quimérico funcional sobre la superficie de sus células, por ejemplo, células presentadoras de antígeno, etc.

En un ejemplo, el polipéptido CMH I quimérico humano/no humano comprende en su porción humana un dominio de unión a péptidos de un polipéptido CMH I humano. En un ejemplo, la porción humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de un CMH I humano. En este ejemplo, la porción humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de una cadena α de un CMH I humano. En un ejemplo, la porción humana del polipéptido quimérico comprende los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de un CMH I humano. En otro ejemplo, la porción humana del polipéptido quimérico comprende los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de un CMH I humano.

En un ejemplo, una porción humana del polipéptido α de CMH II quimérico y/o una porción humana del polipéptido β de CMH II quimérico comprende un dominio de unión a péptido de un polipéptido α de CMH II humano y/o polipéptido β de CMH II humano, respectivamente. En un ejemplo, una porción humana del polipéptido α y/o β de CMH II quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido α y/o β de CMH II humano, respectivamente.

5 En un ejemplo, una porción humana del polipéptido α de CMH II quimérico comprende un dominio $\alpha 1$ de un polipéptido α de CMH II humano; en otro ejemplo, una porción humana del polipéptido α de CMH II quimérico comprende dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de un polipéptido α de CMH II humano. En un ejemplo adicional, una porción humana del polipéptido β de CMH II quimérico comprende un dominio $\beta 1$ de un polipéptido β de CMH II humano; en otro ejemplo, una porción humana del polipéptido β de CMH II quimérico comprende dominios $\beta 1$ y $\beta 2$ de un polipéptido β de CMH II humano.

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

25 Un interés particular son las moléculas HLA, alelos HLA polimórficos específicos, conocidos por estar asociados con un número de enfermedades, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias humanas. De hecho, se han identificado polimorfismos específicos en loci HLA que se correlacionan con el desarrollo de artritis reumatoide, diabetes de tipo I, tiroiditis de Hashimoto, esclerosis múltiple, miastenia grave, enfermedad de Graves, lupus eritematoso sistémico, enfermedad celíaca, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, y otros trastornos autoinmunitarios. Véase, por ejemplo, Wong y Wen (2004) *What can the HLA transgenic mouse tell us about autoimmune diabetes?*, *Diabetologia* 47:1476-87; Taneja y David (1998) *HLA Transgenic Mice as Humanized Mouse Models of Disease and Immunity*, *J. Clin. Invest.* 101: 921-26; Bakker y col. (2006), *A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC*, *Nature Genetics* 38:1166-72 and *Supplementary Information*; y el *International MHC and Autoimmunity Genetics Network* (2009) *Mapping of multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106:18680-85. De este modo, los polipéptidos CMH I y/o II humano o humanizado pueden derivarse de una molécula HLA humana conocida por estar asociada con una enfermedad particular, por ejemplo, enfermedad autoinmunitaria.

40 En un ejemplo específico, el polipéptido CMH I humano o humanizado deriva de HLA-A humano. En un ejemplo específico, el polipéptido HLA-A es un polipéptido HLA-A2 (por ejemplo, polipéptido HLA-A2.1). En un ejemplo, 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 conservativos o no conservativos, secuencias de ácidos nucleicos que difieren de la secuencia descrita en el presente documento debido a la degeneración del código genético, etc.

50 En otro ejemplo específico, la porción humana del polipéptido CMH I quimérico deriva de CMH I humano seleccionado entre HLA-B y HLA-C. En un ejemplo, deriva de HLA-B, por ejemplo, HLA-B27. En otro ejemplo, derivada de HLA-A3, -B7, -Cw6, etc.

En un ejemplo específico, las porciones humanas de los polipéptidos α y β de CMH II descritas en el presente documento derivan de HLA-DR humano, por ejemplo, HLA-DR4. Normalmente, las cadenas α de HLA-DR son monomórficas, por ejemplo, la cadena α del complejo HLA-DR se codifica por un gen HLA-DRA (por ejemplo, gen HLA-DR α *01). Por otro lado, la cadena β de HLA-DR es polimórfica. De este modo, HLA-DR4 comprende una cadena α codificada por gen HLA-DRA y una cadena β codificada por gen HLA-DRB1 (por ejemplo, gen HLA-DR β 1*04). Como se describe en el presente documento a continuación, HLA-DR4 es conocido por estar asociado con la incidencia de un número de enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, artritis reumatoide, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, etc. En un ejemplo, el alelo HLA-DRA es alelo HLA-DR α *01, por ejemplo, HLA-DR α *01:01:01:01. En otro ejemplo, el alelo HLA-DRB1 es HLA-DR β 1*04, por ejemplo, HLA-DR β 1*04:01:01:01. Aunque los presentes Ejemplos describen estas secuencias de HLA particulares; cualquier secuencia de HLA-DR adecuada queda abarcada en el presente documento, por ejemplo, variantes polimórficas mostradas en población humana, secuencias con una o más modificaciones de aminoácidos conservativos o no conservativos, secuencias de ácidos nucleicos que difieren de las secuencias descritas en el presente documento debido a la degeneración del código genético, etc.

Las porciones humanas del polipéptido α y/o β de CMH II quimérico puede codificarse mediante secuencias de nucleótidos de alelos HLA conocidos por estar asociados con enfermedades humanas comunes. Tales alelos HLA incluyen, pero no se limitan a, HLA-DRB1*0401, -DRB1*0301, -DQA1*0501, -DQB1*0201, -DRB1*1501, -DRB1*1502, -DQB1*0602, -DQA1*0102, -DQA1*0201, -DQB1*0202, -DQA1*0501, y combinaciones de los mismos.

5 Para obtener un resumen de las asociaciones entre alelos de HLA y enfermedades, véase Bakker y col. (2006), *anteriormente citado*.

En un ejemplo, la porción no humana de polipéptido(s) quiméricos no humanos CMH I, α CMH II y/o β CMH II comprenden dominios de transmembrana y/o citoplásmicos de un polipéptido(s) no humano endógeno (por ejemplo, roedor, por ejemplo, ratón, rata, de CMH I, α CMH II y/o β CMH II, respectivamente. De este modo, la porción no humana del polipéptido de CMH I humano/no humano quimérico puede comprender dominios de transmembrana y/o citoplásmicos de un polipéptido de CMH I no humano endógeno. La porción no humana de un polipéptido α CMH II quimérico puede comprender dominios de transmembrana y/o citoplásmicos de un polipéptido de CMH II α no humano endógeno. La porción no humana de un polipéptido de CMH II β humano/no humano quimérico puede comprender dominios de transmembrana y/o citoplásmicos de un polipéptido de CMH II β no humano endógeno. En un ejemplo, el animal no humano es un ratón y una porción no humana del polipéptido CMH I quimérico se deriva de una proteína H-2K de ratón. En un ejemplo, el animal es un ratón y las porciones no humanas de los polipéptidos α y β quiméricos CMH II se derivan de una proteína H-2E de ratón. De este modo, una porción no humana del polipéptido quimérico CMH I puede comprender dominios transmembrana y citoplásmicos derivados de una H-2K de ratón y las porciones no humanas de los polipéptidos α y β de CMH II quiméricos pueden comprender dominios transmembrana y citoplásmicos derivados de una proteína H-2E de ratón. Aunque se contemplan secuencias de H-2K y H-2E específicas en los Ejemplos, cualquier secuencia adecuada, por ejemplo, variantes polimórficas, sustituciones de aminoácidos conservativas y no conservativas, etc., están abarcadas en el presente documento.

Un polipéptido quimérico humano/no humano puede ser tal que comprende una secuencia líder (señal) humana o no humana. En un ejemplo, el polipéptido CMH I quimérico comprende una secuencia líder no humana de un polipéptido CMH I endógeno. En un ejemplo, el polipéptido α CMH II quimérico comprende una secuencia líder no humana de un polipéptido α CMH II endógeno. En un ejemplo, el polipéptido β CMH II quimérico comprende una secuencia líder no humana de un polipéptido β CMH II endógeno. En una realización alternativa, el/los polipéptido(s) quimérico(s) CMH I, α CMH II y/o β CMH II comprende(n) una secuencia líder no humana de polipéptido(s) CMH I, α CMH II y/o β CMH II, respectivamente, a partir de otro animal no humano, por ejemplo, otro roedor u otra cepa de ratón. De este modo, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido quimérico CMH I, α CMH II y/o β CMH II puede estar operativamente unido a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder de CMH I, α CMH II y/o β CMH II no humano, respectivamente. En otro ejemplo más, el/los polipéptido(s) quimérico(s) CMH I, α CMH II y/o β CMH II comprende(n) una secuencia líder humana de polipéptido CMH I humano, α CMH II humano y/o β CMH II humano, respectivamente (por ejemplo, una secuencia líder de HLA-A2 humano, HLA-DRA humano y/o HLA-DR β 1*04 humano, respectivamente).

Un polipéptido quimérico del CMH I, α del MHC II y/o β del MHC II humano/no humano puede comprender en su porción humana un dominio extracelular completo o sustancialmente completo de un polipéptido CMH I humano, α CMH II humano y/o β CMH II humano, respectivamente. De este modo, una porción humana puede comprender al menos el 80 %, preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos del 90 %, por ejemplo, 95 % o más los aminoácidos que codifican un dominio extracelular de un polipéptido de CMH I humano, α CMH II humano y/o β CMH II (por ejemplo, HLA-A2 humano, HLA-DRA humano y/o HLA-DR β 1*04 humano). En un ejemplo, el dominio extracelular sustancialmente completo del polipéptido de CMH I, α CMH II humano y/o β CMH II carece de una secuencia líder humana. En otro ejemplo, El polipéptido quimérico del CMH I humano/no humano, α CMH II quimérico humano/no humano y/o β CMH II quimérico humano/no humano comprende una secuencia líder humana.

Además, el polipéptido quimérico CMH I, α CMH II y/o β CMH II puede estar operativamente unido a (por ejemplo, expresarse con el control regulador de) promotor no humano endógeno y elementos reguladores, por ejemplo, elementos reguladores de CMH I, α CMH II y/o β CMH II de ratón, respectivamente. Tal disposición facilitará la expresión adecuada de los polipéptidos CMH I y/o CMH II quiméricos en el animal no humano, por ejemplo, durante la respuesta inmunitaria en el animal no humano.

El animal no humano modificado genéticamente puede seleccionarse entre un grupo que consiste en ratón, rata, conejo, cerdo, bovino (por ejemplo, vaca, toro, búfalo), ciervo, oveja, cabra, pollo, gato, perro, hurón, primate (por ejemplo, tití común, macaco). Para los animales no humanos roedores 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.

En un aspecto, el animal no humano es un mamífero. En un aspecto, el animal no humano es un pequeño mamífero, por ejemplo, de la superfamilia Dipodoidea o Muroidea. En una realización, el animal genéticamente modificado es un roedor. En una realización, el roedor se selecciona entre un ratón, una rata, y un hámster. En una realización, el

roedor se selecciona de la superfamilia Muroidea. En una realización, el animal 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 coliblancas, ratas y ratones de Madagascar), Placanthomyidae (por ejemplo, lirón espinoso), y Spalacidae (por ejemplo, ratas topo, ratas del bambú, y zokores). En una realización específica, el roedor genéticamente modificado se selecciona entre un ratón o rata auténtico (familia Muridae), un jerbo, un ratón espinoso, y una rata 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 roedor y una rata. En una realización, el animal no humano es un ratón.

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/Svlm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (véase, por ejemplo, Festing y col. (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 modificado genéticamente es una mezcla de una cepa 129 anteriormente mencionada y una cepa C57BL/6 anteriormente mencionada. En otra realización específica, el ratón es una mezcla de 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.

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.

De este modo, un ejemplo se refiere a un ratón modificado genéticamente que comprende en su genoma una secuencia de nucleótidos que codifica un MHC II quimérico de humano/ratón, una segunda secuencia de nucleótidos que codifica polipéptidos α quiméricos de CMH II de humano/ratón y una tercera secuencia de nucleótidos que codifica polipéptidos β de CMH II de humano/ratón. Una porción humana CMH I, α CMH II y β CMH II quimérico puede comprender un dominio extracelular de CMH I, α CMH II y β CMH II humano, respectivamente. En un ejemplo, el ratón expresa polipéptidos CMH I, α CMH II y β CMH II humano/no humano quiméricos funcionales a partir del locus CMH de ratón endógeno. En un ejemplo, el ratón no expresa polipéptidos de CMH de ratón funcionales, por ejemplo, polipéptidos de CMH I, α CMH II y β CMH II de ratón funcionales, a partir de su locus de CMH de ratón endógeno.

En un ejemplo, una porción humana del polipéptido del CMH I humano/de ratón quimérico comprende un dominio de unión a péptidos o un dominio extracelular de un CMH I humano (por ejemplo, HLA-A humano, por ejemplo, HLA-A2 humano, por ejemplo, HLA-A2.1 humano). En algunos ejemplos, el ratón no expresa un dominio de unión a péptidos o extracelular de un polipéptido de CMH I de ratón endógeno a partir de su locus de CMH de ratón endógeno. El dominio de unión a péptidos del CMH 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 ejemplo, el dominio extracelular del CMH I humano comprende un dominio extracelular de una cadena α de CMH I humano. En un ejemplo, el locus de CMH I de ratón endógeno es un locus de H-2K (por ejemplo, H-2Kb) y la porción de ratón del polipéptido quimérico CMH I comprende dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido de H-2K (por ejemplo, H-2Kb) de ratón. De este modo, en un ejemplo, el ratón desvelado en el presente documento comprende en su locus de CMH I de ratón endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un CMH I quimérico humano/de ratón, en donde una porción humana del polipéptido quimérico comprende un dominio extracelular de un polipéptido HLA-A2 (por ejemplo, HLA-A2.1) humano y una porción de ratón comprende dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido H-2K (por ejemplo, H-2Kb) de ratón, y un ratón expresa una proteína HLA-A2/H-2K de humano/ratón. En otros ejemplos, la porción de ratón del polipéptido de CMH I quimérico puede derivarse de otro CMH I de ratón, por ejemplo, H-2D, H-2L, etc.; y la porción humana del polipéptido de CMH I quimérico puede derivarse de otro CMH I humano, por ejemplo, HLA-B, HLA-C, etc. En un ejemplo, el ratón no expresa un polipéptido de H-2K endógeno funcional a partir de su locus H-2K de ratón endógeno.

En un ejemplo, una porción humana del polipéptido α del CMH II quimérico de humano/ratón comprende un dominio de unión a péptido α CMH II humano o extracelular o una porción del polipéptido β del CMH II quimérico de humano/ratón comprende un dominio de unión polipéptido β del CMH II humano o extracelular. En algunos ejemplos, el ratón no expresa un dominio de unión a péptido o extracelular de polipéptido α y/o β de ratón endógeno a partir de un locus de ratón endógeno (por ejemplo, locus de H-2A y/o H-2E). En algunos ejemplos, el ratón comprende un genoma que carece de un gen que codifica una molécula de CMH de clase II funcional que comprende un H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2, H-2Ea y una combinación de los mismos. El dominio de unión a

péptido del polipéptido α del CMH II humano puede comprender un dominio $\alpha 1$ y el dominio de unión a péptido del polipéptido β del CMH II humano puede comprender un dominio $\beta 1$; por lo tanto, el dominio de unión a péptido del complejo de CMH II quimérico puede comprender dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ humanos. El dominio extracelular del polipéptido α del CMH humano comprende dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y el dominio extracelular del polipéptido β del CMH II humano puede comprender dominios $\beta 1$ y $\beta 2$; por lo tanto, el dominio extracelular del complejo del CMH II quimérico puede comprender dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$ humanos. En un ejemplo, la porción humana del complejo de CMH II quimérico comprende dominios transmembrana y citosólicos de CMH II de ratón, por ejemplo, H-2E (por ejemplo, dominios transmembrana y citosólicos de H-2E de ratón de cadenas α y β). De este modo, en un ejemplo, el ratón de la invención comprende en su locus de CMH II de ratón endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un α CMH II quimérico humano/de ratón, en donde la porción humana del polipéptido α del CMH II quimérico comprende un dominio extracelular derivado de una cadena α de un CMH II humano (por ejemplos, cadena α de HLA-DR4) y una porción de ratón comprende dominios transmembrana y citoplásmicos derivados de una cadena α de un CMH II de ratón (por ejemplo, H-2E); y un ratón comprende en su locus de CMH II de ratón endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un β de CMH II quimérico humano/de ratón, en donde una porción humana del polipéptido β del CMH II quimérico comprende un dominio extracelular derivado de una cadena β de un CMH II humano (por ejemplo, cadena β de HLA-DR4) y una porción de ratón comprende dominios transmembrana y citoplásmicos derivados de una cadena β de un CMH II de ratón (por ejemplo, H-2E); en donde el ratón expresa una proteína HLA/DR4/H-2E de humano/ratón. En otros ejemplos, la porción de ratón de la proteína de CMH II quimérica puede derivarse de otro CMH II de ratón, por ejemplo, H-2A, etc.; y la porción humana de la proteína de CMH II quimérica puede derivarse de otro CMH II humano, por ejemplo, HLA-DQ, etc. En un ejemplo, el ratón no expresa los polipéptidos H-2A y H-2E endógenos funcionales a partir de sus loci de ratón endógenos (por ejemplo, el ratón no expresa los polipéptidos H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2, y H-2Ea).

En un ejemplo adicional, un animal no humano desvelado en el presente documento, por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón, comprende en un locus de $\beta 2$ microglobulina una secuencia de nucleótidos que codifica una $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada. La $\beta 2$ microglobulina o la cadena ligera del complejo de CMH de clase I (también abreviado como " $\beta 2M$ ") es una proteína no glicosilada pequeña (12 kDa), que funciona principalmente para estabilizar la cadena α de CMH I. La generación de animales de microglobulina humana o humanizada se describe en la solicitud de patente de los EE.UU. n.º 13/661.159. Un ratón que comprende un locus de CMH humanizado tal como se describe en la presente divulgación y un locus de $\beta 2$ microglobulina humana o humanizada tal como se describe en la solicitud de patente de los EE.UU. n.º 13/661.159, puede generarse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, reproducción.

Diversos otros ejemplos de un animal no humano genéticamente modificado, por ejemplo un roedor, por ejemplo, rata o ratón, resultaría evidente a un experto en la técnica a partir de la presente divulgación y a partir de la divulgación de la solicitud de patente de los EE.UU. n.º 13/661.159 y 13/661.116.

En diversos ejemplos desvelados en el presente documento, la(s) secuencia(s) que codifica(n) polipéptidos quiméricos de CMH I y CMH II humano/no humano están situadas en el locus de CMH no humano endógeno (por ejemplo, locus de H-2K y/o H-2E de ratón). En un ejemplo, esto da como resultado una sustitución de un gen(es) de CMH endógeno(s) o una porción del mismo con una(s) secuencia(s) de nucleótidos que codifica(n) polipéptidos de CMH I humanos o humanizados. Puesto que las secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos CMH I, α de CMH II y β de CMH II están situadas en proximidad a entre sí sobre el cromosoma, para conseguir el mayor éxito en la humanización de tanto el CMH I como el CMH II en un animal, los loci de CMH I y CMH II deben dirigirse secuencialmente. De este modo, también se proporcionan en el presente documento métodos de generación de un animal no humano genéticamente modificado que comprende secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de CMH I, α de CMH II y β CMH II humanos/no humanos quiméricos según las reivindicaciones.

En algunas realizaciones, el método utiliza una construcción directora preparada utilizando la tecnología VELOCIGENE®, introduciendo la construcción en las células ES, e introduciendo los clones de células ES dirigidas en un embrión de ratón utilizando la tecnología VELOCIMOUSE®, tal como se describe en los Ejemplos.

Se desvelan en el presente documento construcciones de nucleótidos usadas para generar animales no humanos descritos. En un ejemplo, la construcción de nucleótidos comprende: brazos de homología 5' y 3' no humanos, un fragmento de ADN que comprende las secuencias de la de gen de CMH humano (por ejemplo secuencias de gen de HLA-A2 humano o HLA-DR4 humano) y un casete de selección flanqueado por sitios de recombinación. En un ejemplo, el fragmento de ADN humano es un fragmento genómico que comprende tanto intrones como exones de un gen de CMH humano (por ejemplo gen de HLA-A2 o HLA-DR4 humano). En un ejemplo, los brazos de homología no humanos son homólogos a un locus de CMH no humano (por ejemplo, locus de CMH I o CMH II). En los Ejemplos a continuación se describen construcciones específicas (por ejemplo, FIG. 6 para la construcción de CMH II, MAID 1680; FIG. 8 para la construcción de CMH I, MAID 1665) así como en la solicitud de EE.UU. n.º 13/661.159 y 13/661.116.

Un casete de selección es una secuencia de nucleótidos insertada en una construcción directora 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. Habitualmente, un casete de selección permite la selección

positiva en presencia de un antibiótico concreto (por ejemplo, Neo, Hyg, Pur, CM, Spec, etc.). Además, un casete de selección puede estar flanqueado por sitios de recombinación, que permiten la delección del casete de selección tras el tratamiento con enzimas recombinasa. Los sitios de recombinación normalmente utilizados son *loxP* y *Frt*, reconocidos por las enzimas Cre y Flp, respectivamente, pero se conocen otros en la técnica. En un ejemplo, el casete de selección está situado en el extremo 5' del fragmento de ADN humano. En otro ejemplo, el casete de selección está situado en el extremo 3' del fragmento de ADN humano. En otro ejemplo, el casete de selección está situado dentro del fragmento de ADN humano. En otro ejemplo, el casete de selección está situado dentro de un intrón del fragmento de ADN humano.

- 10 En un ejemplo, los brazos de homología 5' y 3' no humanos comprenden secuencia genómica en las localizaciones 5' y 3', respectivamente, de un locus de gen del CMH de clase I o clase I no humano (por ejemplo, murino) endógeno (por ejemplo, 5' de la primera secuencia líder y 3' del exón $\alpha 3$ del gen de CMH I de ratón o en la dirección 5' del gen H-2Ab1 de ratón y en la dirección 3' del gen H-2Ea de ratón). En un ejemplo, el locus del CMH de clase I endógeno se selecciona entre H-2K, H-2D y H-2L. En un ejemplo específico, el locus del CMH de clase I endógeno H-2K de ratón. En un ejemplo, el locus del CMH II endógeno se selecciona entre H-2E y H-2A. En un ejemplo, la construcción del CMH II modificada por ingeniería permite la sustitución de ambos genes H-2E y H-2A de ratón.

De este modo, en un ejemplo, se proporciona en el presente documento un método de generación de un animal no humano genéticamente modificados (por ejemplo, roedor, por ejemplo, rata o ratón) capaz de expresar proteínas de CMH I y II humanizadas que comprende reemplazar en un locus de CMH II no humano endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un complejo de CMH II no humano con una secuencia de nucleótidos que codifica un complejo de CMH II humano/no humano quimérico para generar un primer animal no humano; y reemplazar en un locus de CMH I no humano endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CMH I no humano con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CMH I humano/no humano quimérico para generar un segundo animal no humano. En una realización, las etapas de reemplazar secuencias de nucleótidos comprenden la recombinación homóloga en células ES. En un ejemplo, el segundo animal no humano se genera mediante recombinación homóloga en células ES que portan secuencias de nucleótidos que codifican complejo CMH II humano/no humano. Como alternativa, también se desvela en el presente documento un método de generación de un animal no humano genéticamente modificados (por ejemplo, roedor, por ejemplo, rata o ratón) capaz de expresar proteínas de CMH I y II humanizadas que comprende reemplazar en un locus de CMH I no humano endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CMH I no humano con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de CMH I humano/no humano quimérico para generar un primer animal no humano; y reemplazar en un locus de CMH II no humano endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un complejo de CMH II no humano con una secuencia de nucleótidos que codifica un complejo de CMH II humano/no humano quimérico para generar un segundo animal no humano. En tales ejemplos, el segundo animal no humano se genera mediante recombinación homóloga en células ES que porta una secuencia de nucleótidos que codifican polipéptido CMH I humano/no humano.

Tras completar el direccionamiento del gen, las células ES o los animales no humanos modificados genéticamente se criban para confirmar la incorporación correcta de la secuencia de nucleótidos exógena de interés o la expresión del polipéptido exógeno. Los expertos en la materia conocen numerosas técnicas que incluyen (aunque no de forma limitativa) la transferencia Southern, la PCR larga, la PCT cuantitativa (por ejemplo, la PCR en tiempo real usando TAQMAN®), la hibridación mediante fluorescencia *in situ*, transferencia de Northern, citometría de flujo, análisis por transferencia de Western, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, etc. En un ejemplo, los animales no humanos (por ejemplo, ratones) que contienen la modificación genética de interés pueden identificarse mediante selección para la pérdida de alelos del ratón y/o la ganancia de alelos humanos utilizando una modificación del ensayo de alelos descrito en Valenzuela y col. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659. Los expertos en la materia conocen otros ensayos que identifican un nucleótido o secuencia de aminoácidos específicos en los animales modificados genéticamente.

Se desvela en el presente documento una célula que expresa proteínas de CMH I y CMH II quiméricas humanas/no humanas (por ejemplo, proteínas HLA-A2/H-2K y HLA-DR4/H-2E). En un ejemplo, la célula comprende un vector de expresión que comprende una secuencia de CMH de clase I quimérico y una secuencia de CMH de clase II quimérico tal como se describe en el presente documento. En un ejemplo, la célula se selecciona entre CHO, COS, 293, HeLa, y una célula retinal que expresa una secuencia de ácido nucleico vírico (por ejemplo, una célula PERC.6™).

Un complejo CMH II quimérico que comprende un dominio extracelular de HLA-DR4 descrito en el presente documento puede detectarse mediante anticuerpo dirigido contra HLA-DR. De este modo, una célula que muestra polipéptido de CMH II humano/no humano puede detectarse y/o seleccionarse usando anticuerpos dirigidos contra HLA-DR. El complejo CMH I quimérico que comprende un dominio extracelular de HLA-A2 descrito en el presente documento puede detectarse usando anti-HLA-A, por ejemplo, anticuerpos dirigidos contra HLA-A2. De este modo, una célula que muestra un polipéptido de CMH I humano/no humano puede detectarse y/o seleccionarse usando anticuerpo dirigido contra HLA-A. Los anticuerpos que reconocen otros alelos de HLA están comercialmente disponible o pueden generarse y puede usarse para la detección/selección.

Aunque los Ejemplos siguientes describen un animal diseñado mediante ingeniería genética cuyo genoma comprende una sustitución de una secuencia de nucleótidos que codifica las proteínas H-2K, H2-A y H-2E de ratón con una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína HLA-A2/H-2K y HLA-DR4/H-2E de humano/ratón quimérica, respectivamente, el experto en la técnica entendería que se puede usar una estrategia similar para introducir quimeras que comprenden otros genes CMH I y CMH II humanos (otros genes de HLA-A, HLA-B y HLA-C; y otros HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ). También se desvelan tales animales que comprenden múltiples genes de CMH I y CMH II quiméricos humanos/no humanos (por ejemplo, humano/roedor, por ejemplo, humano/ratón) en los loci de CMH endógeno.

En diversos ejemplos, los animales no humanos genéticamente modificados descritos en el presente documento fabrican células, por ejemplo, APC, con CMH I y II humano o humanizado sobre la superficie celular y, como resultado, presentan péptidos como epítomos para linfocitos T de una manera análoga a la humana, ya que, sustancialmente, todos los componentes del complejo son humanos o humanizados. Los animales no humanos modificados genéticamente desvelados en el presente documento 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 estimulan la respuesta inmunitaria (por ejemplo, epítomos de linfocitos T, por ejemplo, epítomos únicos de cáncer humano), por ejemplo, para usar en el desarrollo de vacunas; para evaluar candidatos de vacunas y otras estrategias de vacunas; para estudiar la autoinmunidad humana; para estudiar las enfermedades infecciosas humanas; y de otra forma, para idear mejores estrategias terapéuticas basadas en la expresión del CMH humano.

Ejemplos

La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos. Se exponen estos Ejemplos para ayudar en la comprensión de la invención, pero no se pretende, y no se debería interpretar, que limiten su alcance de ninguna manera. Los ejemplos no incluyen descripciones detalladas de métodos convencionales que serían bien conocidos para los expertos en la técnica (técnicas de clonación molecular, etc.). Salvo que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, la masa molecular es la masa molecular promedio, la temperatura se indica en grados Celsius, y la presión es la atmosférica o casi atmosférica.

30 **Ejemplo 1: Ingeniería genética de un locus de CMH II quimérico de humano/ratón y generación de ratones CMH II quiméricos**

Ejemplo 1.1: Deleción de los loci H-2A y H-2E de CMH de clase II endógenos

Se preparó el vector de dirección para introducir una deleción de los genes H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2, y H-2Ea de CMH de clase II endógenos utilizando la tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. 6.586.251 y Valenzuela y col., *anteriormente citado*). Se modificó el ADN del cromosoma artificial bacteriano (BAC) RP23-458i22 (Invitrogen) para eliminar los genes CMH de clase II endógenos H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2, y H2Ea.

En resumen, los brazos de homología en la dirección 5' y en la dirección 3' se derivaron mediante la PCR del ADN del BAC de ratón a partir de las localizaciones 5' del gen H-2Ab1 y 3' del gen H-2Ea, respectivamente. Como se representa gráficamente en la FIG. 5, estos brazos de homología se utilizaron para preparar un casete que eliminaba ~79 kb de RP23-458i22 que comprendía los genes H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2 y H-2Ea del locus CMH de clase II mediante recombinación homóloga bacteriana (BHR). Esta región se sustituyó por un casete de higromicina flanqueado por los sitios lox66 y lox71. El vector de dirección final desde 5' a 3' incluyó un brazo de homología de 34 kb que comprende la secuencia 5' genómica de ratón en el gen H-2Ab1 del locus CMH de clase II endógeno, un sitio 5' lox66, un casete de higromicina, un sitio 3' lox71 y un brazo de homología de 63 kb que comprende la secuencia 3' genómica de ratón en el gen H-2Ea del locus CMH de clase II endógeno (MAID 5111, véase la FIG. 6).

Se usó el vector de dirección del ADN del BAC (descrito anteriormente) para electroporar las células ES de ratón para crear células ES modificadas que comprenden una deleción del locus CMH de clase II endógeno. Las células ES positivas que contenían un locus CMH de clase II endógeno eliminado se identificaron mediante el ensayo de la PCR cuantitativa usando sondas TAQMAN™ (Lie y Petropoulos (1998) Curr. Opin. Biotechnology 9:43-48). La región en la dirección 5' del locus eliminado se confirmó mediante la PCR utilizando los cebadores 5111U F (CAGAACGCCAGGCTGTAAC; SEQ ID NO:1) y 5111U R (GGAGAGCAGGGTCAGTCAAC; SEQ ID NO:2) y la sonda 5111U P (CACCCGCACTCACAGCTCCTTACA; SEQ ID NO:3), mientras que la región en la dirección 3' del locus detectado se confirmó utilizando los cebadores 5111D F (GTGGGCACCATCTTCATCATTC; SEQ ID NO:4) y 5111D R (CTTCCTTTCCAGGGTGTGACTC; SEQ ID NO: 5) y la sonda 5111D P (AGGCCTGCGATCAGGTGGCACCT; SEQ ID NO: 6). Se confirmó la presencia del casete de higromicina procedente del vector director utilizando los cebadores HYGF (TGCGCCGATCTTAGCC; SEQ ID NO:7) y HYGR (TTGACCGATTCTTGCGG; SEQ ID NO:8) y la sonda HYGP (ACGAGCGGGTTCGGCCCCATTC; SEQ ID NO: 9). La secuencia de nucleótidos a través del punto de deleción en 5' (SEQ ID NO: 10) incluyó lo siguiente, que indica la secuencia endógena de ratón en la dirección 5' del punto de deleción (contenida en los paréntesis siguientes) unida de forma contigua a la secuencia del casete presente en el punto de deleción: (TTTGTAACA AAGTCTACCC AGAGACAGAT GACAGACTTC AGCTCCAATG CTGATTGGTT CCTCACTTGG GACCAACCCT) CTCGAGTACC

- GTTCGTATAA TGTATGCTAT ACGAAGTTAT ATGCATCCGG GTAGGGGAGG. La secuencia de nucleótidos a través del punto de delección en la dirección 3' (SEQ ID NO:11) incluyó lo siguiente, que indica la secuencia del casete contigua de la secuencia endógena de ratón en la dirección 3' del punto de delección (contenida en los paréntesis siguientes): CCTCGACCTG CAGCCCTAGG ATAACCTCGT ATAATGTATG CTATACGAAC
- 5 GGTAGAGCTC (CACAGGCATT TGGGTGGGCA GGGATGGACG GTGACTGGGA CAATCGGGAT GGAAGAGCAT AGAATGGGAG TTAGGGAAGA). Los clones de células ES positivos se utilizaron a continuación para implantar ratones hembras utilizando el método VELOCIMOUSE® (descrito a continuación) para generar una camada de crías que contenían una delección del locus CMH de clase II endógeno.
- 10 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 y col. (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). Se identificaron ratones que contenían una delección en los genes H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2, y H-2Ea en el locus CMH de clase II endógeno mediante genotipado usando una modificación del ensayo de alelos (Valenzuela y col., citado anteriormente) que detectó la presencia del casete de higromicina y confirmó la ausencia de las secuencias del CMH de clase II endógeno.
- 15 Se identificaron ratones que contenían una delección en los genes H-2Ab1, H-2Aa, H-2Eb1, H-2Eb2, y H-2Ea en el locus CMH de clase II endógeno se pueden reproducir para criar una cepa de ratón eliminadora de Cre (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2009/114400) a fin de eliminar cualquier casete de higromicina floxeado introducido por el vector director que no se elimina, por ejemplo, en la fase de célula ES o en el embrión. Opcionalmente, el casete de higromicina queda retenido en los ratones.
- 20 *Ejemplo 1.2: Generación de vectores directores grandes (LTVEC) que comprenden genes H-2Eb1 y H-2Ea humanizados*
- 25 Se diseñó un vector director para introducir secuencias de CMH II humanizadas como se representa gráficamente en la FIG 5. Utilizando la tecnología de ingeniería genética VELOCIGENE®, se modificó el ADN del cromosoma artificial bacteriano (BAC) RP23-458i22 en diversos pasos para: (1) crear un vector que comprende un exón 1 de I-E α funcional a partir del gen BALB/c H-2Ea (Fig. 5A); (2) crear un vector que comprende la sustitución de los exones 2 y 3 del gen I-E β de ratón con los de DR β 1*04 de humano y la sustitución de los exones 2 y 3 de I-E α de ratón con los de DR α 1*01 humano (FIG. 5B); (3) crear un vector que transporta los exones 2 y 3 de DR α 1*04 humano entre los restantes exones I-E β de ratón, y los exones 2 y 3 de DR β 1*01 humano entre los restantes exones I-E α de ratón
- 30 incluyendo un exón 1 de I-E α funcional de ratón BALB/c (paso (1) (Fig. 5C); y (4) eliminar un sitio de corte y empalme críptico en el vector generado en (3) (Fig. 5D).
- 35 Específicamente, puesto que en los ratones C57Bl/6, el gen I-E α es un pseudogén debido a la presencia de un exón 1 no funcional, en primer lugar, se creó un vector que comprendía un exón 1 de I-E α funcional a partir del gen H2Ea de BALB/c (Fig. 5A). Se modificó el BAC RP23-458i22 mediante recombinación homóloga bacteriana (1.BHR) para sustituir el gen de resistencia al cloranfenicol por el de la espectromicina. El vector resultante se modificó adicionalmente mediante BHR para sustituir la región de codificación de I-A e I-E completa por un casete de neomicina flanqueado por sitios de recombinación (2.BHR). Otro ciclo de BHR (3. BHR) con la construcción que comprende un exón que codifica la secuencia líder de I-E α (exón 1) de BALB/c y el gen del cloranfenicol flanqueado por los sitios de restricción PI-SceI e I-CeuI dio como resultado un vector que comprendía el exón 1 de H-2Ea de BALB/c funcional.
- 40 De manera independiente, para generar un vector que comprendía la sustitución de los exones 2 y 3 del gen I-E β de ratón por los del DR β 1*04 humano y la sustitución de los exones 2 y 3 de I-E α de ratón por los de DR α 1*01 humano, se modificó el BAC de RP23-458i22 mediante diversas etapas de recombinación homóloga, 4. BHR - 8. BHR (Fig. 5B). La secuencia de ácido nucleico resultante estaba flanqueada por los sitios de restricción PI-SceI/I-CeuI para permitir la ligadura en la construcción que transporta el exón 1 de I-E α de BALB/c, mencionado anteriormente (Fig. 5C).
- 45 La secuencia de la construcción final representada gráficamente en la Fig. 5C contenía un sitio de corte y empalme críptico en el extremo 3' del intrón de BALB/c. Se llevaron a cabo diversas etapas de BHR (11. BHR - 12. BHR) seguidas por una etapa de delección para obtener el vector director final (MAID 1680) que se utilizó para su electoporación en células ES (Fig. 5D).
- 50 En detalle, el vector director final (MAID 1680), de 5' a 3', estaba comprendido por un brazo de homología 5' consistente en una secuencia genómica de ratón de ~26 kb que finaliza exactamente en la dirección 5' del gen H2Ab1 del locus MHC de clase II endógeno; una inserción de ~59 kb que contenía el gen de la cadena β de CMH II humanizado (gen H-2Eb1 humanizado) y el gen de la cadena α de CMH II humanizado (gen H-2Ea humanizado) y un casete de neomicina floxeado; y un brazo de homología 3' de ratón consistente en una secuencia genómica de ratón de ~57 kb que comienza exactamente en la dirección 3' del gen H-2Ea del locus CMH de clase II endógeno. La secuencia de nucleótidos a través de la unión entre el brazo 5' y la inserción (SEQ ID NO:12) incluía lo siguiente:
- 55
- 60
- 65

(TGCTGATTGG TTCCTCACTT GGGACCAACC C) TAAGCTTTA TCTATGTCGG GTGCGGAGAA AGAGGTAATG AAATGGCACA AGGAGATCAC ACACCCAAAC CAAACTCGCC, donde la secuencia en cursiva es un único sitio PI-Scel, y la secuencia genómica de ratón en el brazo de homología 5' está en paréntesis. La secuencia de nucleótidos a través de la unión entre la inserción y el brazo 3' (SEQ ID NO: 13) incluía lo siguiente: CACATCAGTG
 5 AGGCTAGAAT AAATTTAAAAT CGCTAATATG AAAATGGGG (ATTTGTACCT CTGAGTGTGA AGGCTGGGAA GACTGCTTTC AAGGGAC), donde la secuencia genómica de ratón en el brazo de homología 3' está en paréntesis.

En la inserción de ~59 kb, el gen H-2Eb1 estaba modificado como sigue: una región de 5136 pb de H-2Eb1, incluyendo los últimos 153 pb del intrón 1, el exón 2, el intrón 2, el exón 3, y los primeros 122 pb del intrón 3, se
 10 sustituyeron con los 3111 pb de la región homóloga del HLA-DRB1*04 humano, incluyendo los últimos 148 pb del intrón 1, el exón 2, el intrón 2, el exón 3, y los primeros 132 pb del intrón 3. En la unión entre las secuencias de ser humano y ratón del intrón 3, se insertó un casete que consistía en un sitio 5' lox2372, el promotor UbC, el gen de resistencia a la neomicina, y un sitio 3' lox2372. El gen resultante codificó una proteína HLA-DRB1*04/H-2Eb1 quimérica que comprende la secuencia líder de H-2Eb1 de ratón, los dominios β1 y β2 humanos de DRB1*04, y el
 15 dominio transmembrana y la cola citoplásmica de ratón. La secuencia de nucleótidos a través de la unión de ratón/humano en el intrón 1 (SEQ ID NO: 14) incluía lo siguiente: (TCCATCACTT CACTGGGTAG CACAGCTGTA ACTGTCCAGC CTG) GGTACCGAGC TCGGATCCAC TAGTAACGGC CGCCAGTGTG CTGGAATTC GCCCTTGATC GAGCTCCCTG GGCTGCAGGT GGTGGGCGTT GCGGGTGGGG CCGGTAA, donde la secuencia en cursiva es un sitio de clonación múltiple introducido durante las etapas de clonación, y las secuencias del intrón 1 de ratón están en paréntesis. La secuencia de nucleótidos a través de la unión entre el intrón 3 y el casete de neomicina (SEQ ID NO: 15) incluía lo siguiente: (ATCTCCATCA GAAGGGCACC GGT) ATAACCTT CGTATAAGGT ATCCTATACG AAGTTATATG CATGGCCTCC GCGCCGGGTT, donde el sitio 5' lox2372 está en cursiva, y la secuencia del intrón 3 humano está en paréntesis. La secuencia de nucleótidos a través de la unión entre el casete de neomicina y el intrón 3 de ratón (SEQ ID NO: 16) incluía lo siguiente: ATAACCTTCGT
 20 ATAAGGTATC CTATACGAAG TTATCTCGAG (TGGCTTACAG GTAGTGCGT GAAGCTTCTA CAAGCACAGT TGCCCCCTGG), donde el sitio 3' lox2372 está en cursiva, y la secuencia del intrón 3 de ratón está entre paréntesis.

También comprendido en la inserción de ~59 kb, el gen H-2Ea estaba modificado como sigue: una región de 1185 pb de H-2Ea, incluyendo los últimos 101 pb del intrón 1, el exón 2, el intrón 2, el exón 3, y los primeros 66 pb del
 30 intrón 3, se sustituyeron con los 1189 pb de la región homóloga del HLA-DRA1*01 humano, incluyendo los últimos 104 pb del intrón 1, el exón 2, el intrón 2, el exón 3, y los primeros 66 pb del intrón 3. Como se ha descrito anteriormente, como el exón 1 del alelo C57BL/6 de H-2Ea contiene una delección que vuelve el gen no funcional, el exón 1 de H-2Ea y el resto del intrón 1 se sustituyeron por la región equivalente de 2616 pb del alelo BALB/c de H-2Ea, que es funcional. El gen resultante codificó una proteína H-2Ea/HLA-DRA1*01 que comprende la secuencia líder de H-2Ea del ratón BALB/c, los dominios α1 y α2 humanos de DRA1*01, y el dominio transmembrana y la cola
 35 citoplásmica de ratón. La secuencia de nucleótidos a través de la unión de ratón/humano en el intrón 1 (SEQ ID NO: 17) incluía lo siguiente: (CTGTTTCTTC CCTAACTCCC ATTCTATGCT CTTCCATCCC GA) CCGCGGCCCA ATCTCTCTCC ACTACTTCCCT GCCTACATGT ATGTAGGT, donde la secuencia en cursiva es un sitio de la enzima de restricción introducido durante las etapas de clonación, y las secuencias del intrón 1 de BALB/c están en paréntesis. La secuencia de nucleótidos a través de la unión de humano/ratón en el intrón 3 (SEQ ID NO: 18) incluía lo siguiente: CAAGGTTTCC TCCTATGATG CTTGTGTGAA ACTCGGGGCC GGCC (AGCATTTAAC AGTACAGGGA TGGGAGCACA GCTCAC), donde la secuencia en cursiva es un sitio de la enzima de restricción introducido durante las etapas de clonación, y las secuencias del intrón 3 de ratón están en paréntesis. La secuencia de nucleótidos a través de la unión de C57BL/6-BALB/c en 5' del exón 1 (Id. de sec. n.º:19) incluía lo siguiente:
 40 (GAAAGCAGTC TTCCAGCCT TCACACTCAG AGGTACAAAT) CCCCATTTTC ATATTAGCGA TTTTAATTTA TTCTAGCCTC, donde las secuencias específicas de C57BL/6 están entre paréntesis. La secuencia de nucleótidos a través de la unión BALB/c-C57BL/6 en 3' del exón 1 (SEQ ID NO:20) incluía lo siguiente: TCTTCCCTAA CTCCATTCT ATGCTCTTCC ATCCCGA CCG CGG (CCCAATC TCTCTCCACT ACTTCTGACC TACATGTATG), donde el sitio de restricción SacII está en cursiva, y las secuencias C57BL/6 están en paréntesis.

50 *Ejemplo 1.3: Generación de ratones CMH II humanizados*

Se presentan en la FIG. 6 diagramas simplificados de la estrategia para generar ratones CMH II humanizados utilizando el vector del Ejemplo 1.2.

55 Específicamente, se utilizó el ADN del BAC MAID1680 (descrito anteriormente) para electroporar células ES MAID5111 para crear células ES modificadas que comprenden una sustitución de los loci I-A e I-E endógenos de ratón con un fragmento genómico que comprende un locus quimérico de DR4 humano/I-E de ratón. Las células ES positivas que contienen los loci I-A e I-E endógenos eliminados sustituidos por un fragmento genómico que
 60 comprende un locus quimérico de DR4 humano/IE de ratón se identificaron mediante un ensayo de la PCR cuantitativa usando las sondas TAQMAN™ (Lie y Petropoulos, anteriormente citado). Se confirmó la inserción de secuencias DRα humanas mediante la PCR usando los cebadores hDRA1F (CTGGCGGCTTGAAGAATTTGG; SEQ ID NO:21), hDRA1R (CATGATTTCCAGGTTGGCTTTGTC; SEQ ID NO:22) y la sonda hDRA1P (CGATTTGCCAGCTTTGAGGCTCAAGG; SEQ ID NO: 23). Se con firmó la inserción de secuencias DRβ humanas mediante la PCR usando los cebadores hDRB1F (AGGCTTGGGTGCTCCACTTG; SEQ ID NO:24), hDRB1R (GACCCTGGTGATGCTGGAAAC; SEQ ID NO:25) y la sonda hDRB1P (CAGGTGTAACCTCTCCACTCCGAGGA;

SEQ ID NO: 26). Se confirmó la pérdida del casete de higromicina del vector director con los cebadores HYGf (TGCGGCCGATCTTAGCC; SEQ ID NO:7) y HYGR (TTGACCGATTCTTGCGG; SEQ ID NO:8) y la sonda HYGp (ACGAGCGGGTTCGGCCATTC; SEQ ID NO: 9).

5 A continuación se utilizaron los clones ES positivos para implantar ratones hembras utilizando el método VELOCIMOUSE® (anteriormente citado) para generar una camada de crías que contenía una sustitución de los loci I-A e I-E endógenos con un locus de DR4 humano/I-E de ratón. Las células ES 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®. Se identificaron los ratones que contenían un locus de DR4 humano/I-E de ratón
10 mediante genotipado utilizando un ensayo de alelos (Valenzuela y col., citado anteriormente) que detectó la presencia de un locus quimérico de DR4 humano/I-E de ratón.

Los ratones que contienen un locus quimérico de DR4 humano/I-E de ratón se pueden reproducir para crear una cepa de ratón eliminadora de Cre (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2009/114400) a fin de eliminar cualquier casete de neomicina floxeado introducido por el vector director que no se elimina, por ejemplo, en la fase de célula ES o en el embrión (véase, FIG. 7).

Ejemplo 2: Ingeniería genética de un locus de CMH I quimérico de humano/ratón y generación de ratones CMH I quiméricos

20 El gen H-2K de ratón se humanizó en una única etapa mediante la construcción de un único vector director a partir de ADN (BAC) de cromosoma artificial bacteriano de humano y ratón utilizando la tecnología de VELOCIGENE® (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. 6.586.251 y Valenzuela y col. (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. Nat. Biotech. 21(6): 652-659). Se modificó ADN de clon BAC de ratón RP23-173k21 (Invitrogen) mediante recombinación homóloga para sustituir 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 subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del gen HLA-A humano (FIG. 8).

30 En resumen, la secuencia genómica que codifica las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de ratón del gen H-2K se sustituye 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 director 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; brazo de homología 5' se indica en la SEQ ID NO:27) y un brazo de homología 3' de ratón que contiene la secuencia genómica 3' de la secuencia codificadora de $\alpha 3$ de H-2K de ratón (el brazo de homología 3' se indica en la SEQ ID NO:28).

40 La construcción final para direccionar el locus de gen de H-2K endógeno de 5' a 3' incluía (1) un brazo de homología 5' que contenía ~200 pb de secuencia 5' genómica de ratón del gen H-2K endógeno que incluye la UTR 5', (2) ~1339 pb de secuencia genómica humana que incluye la secuencia líder de HLA-A*0201, el 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 de *loxP* 5', (4) un casete de higromicina, (5) un sitio de *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 el $\alpha 3$ de H-2K de ratón y secuencias codificadoras de transmembrana (véase FIG. 8 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 indica en la SEQ ID NO:29 y la secuencia de 159 nucleótidos en el punto de unión de las secuencias de humano/ratón en el 3' del vector de direccionamiento se indica en la SEQ ID NO:30. La recombinación homóloga con este vector de direccionamiento creó un locus de 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 codificadoras de dominio transmembrana y citoplásmico de H-2K de ratón endógena que, tras su translación, lleva a la formación de una proteína de CMH de clase I quimérico de humano/ratón.

55 El ADN de BAC direccionado se usó para electroporar células ES de F1H4 de ratón para crear células Es modificadas para generar ratones que expresan una proteína del CMH 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).
60 La Tabla 2 identifica los nombres y localizaciones detectados para cada una de las sondas usadas en los ensayos de la PCR cuantitativa.

Tabla 2: Sondas usadas para el genotipado

Sonda	Ensayo	Región detectada por sonda	Secuencia	SEQ ID NO
HYG	GOA	Casete de higromicina	ACGAGCGGGTTCGGCCCATTC	9
1665H1	GOA	intrón $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de HLA-A2 humana	AGTCCTTCAGCCTCCACTCAGGTCAGG	31
1665H2	GOA	exón $\alpha 2$ de HLA-A2 humana	TACCACCAGTACGCCTACGACGGCA	32
5112H2	GOA	intrón $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de HLA-A2 humana	ATCCTGTACCAGAGAGTG	33

- 5 El casete de selección puede retirarse mediante métodos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, las células ES que portan el locus del CMH de clase I quimérico de humano/ratón puede transfectarse con una construcción que expresa Cre para retirar el casete de higromicina "floxead" introducido mediante la inserción de la construcción de direccionamiento que contiene secuencias de gen de HLA-A*0201 humana (véase FIG: 8). El casete de higromicina puede retirarse opcionalmente reproduciéndolo a ratones que expresan Cre recombinasa. Opcionalmente, el casete de higromicina queda retenido en los ratones.
- 10 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 y col. (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 CMH de clase I quimérico se identificaron mediante genotipado usando un ensayo de modificación de alelo (Valenzuela y col., anteriormente citado) que detecta la presencia de las secuencias de gen de HLA-A*0201 humanas únicas.

Ejemplo 3: Generación y caracterización de ratones que comprenden genes del CMH I y CMH II quimérico

20 Ejemplo 3.1: Generación de ratones que comprenden genes del CMH I y CMH II quimérico

- La estrategia para la generación de ratones que comprenden genes del CMH I y CMH II se ilustra en la FIG. 4. Específicamente, Se usó ADN de BAC MAID1665 (BAC de HLA-A2/H-2K descrito anteriormente en el Ejemplo 2) para electroporar células ES de MAID1680 (células ES que portan un gen de CMH I humanizado descrito en el Ejemplo 1) para crear células ES modificadas que comprenden genes de CMH I y CMH II quiméricos de humano/ratón. Las células ES positiva que contienen genes de tanto CMH I como II se identificaron mediante ensayo de PCR cuantitativo usando sondas TAQMAN™ (Lie y Petropoulos, anteriormente citado) usando cebadores y sondas descritos en los Ejemplos 1 y 2 anteriormente.
- 30 Los casetes de selección de HYG y NEO pueden retirarse mediante métodos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, las células ES que portan los loci de CMH de clase I y clase II quimérico de humano/ratón pueden transfectarse con una construcción que expresa Cre para retirar los casetes de higromicina y neomicina "floxeados" introducidos mediante la inserción de las construcciones de direccionamiento (véase FIG. 4, 7 y 8). Los casetes de selección pueden retirarse opcionalmente reproduciéndolo a ratones que expresan Cre recombinasa. Opcionalmente, el casete de selección queda retenido en los ratones.

- Las células ES dirigidas que comprenden tanto CMH I como II 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 y col. (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 genes del CMH de clase I y clase II quiméricos se identificaron mediante genotipado usando un ensayo de modificación de alelo (Valenzuela y col., anteriormente citado).

45 Ejemplo 3.2: Caracterización de ratones que comprenden genes del CMH I y CMH II quimérico

- Bazos de ratones WT o de doble heterocigoto humanizados HLA-A2/HLA-DR4 ("1666HET/1681 HET" o "H-2K⁺¹⁶⁶⁶MHC-II⁺¹⁶⁸¹") se purificaron con colagenasa D (Roche Bioscience) y los eritrocitos se sometieron a lisis con un tampón de lisis de ACK. La expresión de superficie celular de HLA-A2 y HLA-DR4 humana se analizó mediante FACS usando anti-CD3 (17A2), anti-CD19 (1D3), anti-HLA-A2 (BB7.2) y anti-HLA-DR (L243) conjugado con fluorocromo. Se llevó a cabo la citometría de flujo usando BD-Fortessa. La expresión de tanto HLA-A2 como HLA-DR4 humana fue claramente detectable sobre la superficie de los linfocitos B CD19+ (FIG. 9).

Equivalentes

Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar usando solamente experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descrita en el presente documento. Se entiende que dichos equivalentes están abarcados por las siguientes reivindicaciones.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

10

<120> RATONES QUE EXPRESAN COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD HUMANO

<130> EAH/FP7142227

15

<140> EP 14708429.7

<141> 20/02/2014

<150> PCT/US2014/017387

<151> 20/02/2014

20

<150> US 61/767.811

<151> 22/02/2013

<160> 33

25

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 19

<212>ADN

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

35

<400> 1

cagaacgccca ggctgtaac 19

<210> 2

<211> 20

40

<212>ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

45

<400> 2

ggagagcagg gtcagtcaac 20

<210> 3

<211> 24

50

<212>ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

55

<400> 3

caccgccact cacagctcct taca 24

<210> 4

<211> 22

60

<212>ADN

<213> Secuencia artificial

65

<220>

<223> Sintético

ES 2 798 751 T3

	<400> 4 gtgggcacca tctcatcat tc	22
5	<210> 5 <211> 22 <212>ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintético	
15	<400> 5 cttccttcc aggggtgtgac tc	22
20	<210> 6 <211> 23 <212>ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
25	<400> 6 aggcctgcga tcaggtggca cct	23
30	<210> 7 <211> 17 <212>ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
35	<400> 7 tgcggccgat ctagcc	17
40	<210> 8 <211> 18 <212>ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
45	<400> 8 ttgaccgatt ccttgagg	18
50	<210> 9 <211> 21 <212>ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
55	<400> 9 acgagcgggt tcggccatt c	21
60	<210> 10 <211> 140 <212>ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sintético	
65	<220> <223> Sintético	

ES 2 798 751 T3

	<400> 10		
		tttgtaaaca aagtctaccc agagacagat gacagacttc agctccaatg ctgattggtt	60
		cctcacttgg gaccaaccct ctcgagtacc gttcgtataa tgtatgctat acgaagttat	120
		atgcatccgg gtaggggagg	140
5	<210> 11 <211> 140 <212>ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Sintético		
	<400> 11		
		cctcgacctg cagccctagg ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaac ggtagagctc	60
		cacaggcatt tgggtgggca gggatggacg gtgactggga caatcgggat ggaagagcat	120
		agaatgggag ttagggaaga	140
15	<210> 12 <211> 110 <212>ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Sintético		
	<400> 12		
25			
		tgctgattgg ttcctcactt gggaccaacc ctaagcttta tctatgtcgg gtgctggagaa	60
		agaggtaatg aaatggcaca aggagatcac acacccaaac caaactcgcc	110
30	<210> 13 <211> 96 <212>ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Sintético		
35	<400> 13		
		cacatcagtg aggctagaat aaattaaaat cgctaatatg aaaatgggga tttgtacctc	60
		tgagtgtgaa ggctgggaag actgctttca agggac	96
40	<210> 14 <211> 150 <212>ADN <213> Secuencia artificial		
45	<220> <223> Sintético		

ES 2 798 751 T3

<400> 14

tccatcactt cactgggtag cacagctgta actgtccagc ctgggtaccg agctcggatc	60
cactagtaac ggccgccagt gtgctggaat tcgcccttga tcgagetccc tgggctgcag	120
gtgggtgggcg ttgcgggtgg gcccggttaa	150

5 <210> 15
 <211> 80
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 15

atctccatca gaagggcacc ggtataactt cgtataaggt atcctatacg aagttatatg	60
catggcctcc gcgccgggtt	80

15 <210> 16
 <211> 90
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético

<400> 16

ataacttcgt ataaggtatc ctatacgaag ttatctcgag tggcttacag gtaggtgcgt	60
gaagcttcta caagcacagt tgccccctgg	90

30 <210> 17
 <211> 90
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sintético

<400> 17

ctgtttottc cetaactccc attctatgct ctccatccc gaccgcggcc caatctctct	60
ccactacttc ctgcctacat gtatgtaggt	90

40 <210> 18
 <211> 80
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintético

<400> 18

ES 2 798 751 T3

	caaggtttcc tcctatgatg cttgtgtgaa actcggggcc ggccagcatt taacagtaca	60
	gggatgggag cacagctcac	80
5	<210> 19 <211> 80 <212>ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintético <400> 19	
	gaaagcagtc ttcccagcct tcacactcag aggtacaaat cccattttc atattagcga	60
	ttttaattta ttctagcctc	80
15	<210> 20 <211> 80 <212>ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintético <400> 20	
	tcttcctaa ctcccattct atgctcttcc atcccgaccg cggcccaatc tctctccact	60
25	acttcctgcc tacatgtatg	80
30	<210> 21 <211> 21 <212>ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético	
35	<400> 21 ctggcggctt gaagaattg g 21	
40	<210> 22 <211> 24 <212>ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sintético <400> 22 catgattcc aggtggctt tgtc 24	
50	<210> 23 <211> 26 <212>ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Sintético <400> 23	

ES 2 798 751 T3

cgatttgcca gcttgaggc tcaagg 26

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

10 <220>
<223> Sintético

<400> 24
aggcttgggt gctccactg 20

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

20 <220>
<223> Sintético
<400> 25
gaccctggtg atgctgaaa c 21

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

30 <220>
<223> Sintético

<400> 26
caggtgtaaa cctctccact ccgagga 27

35 <210> 27
<211> 200
<212>ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintético

<400> 27

ggattcccca tctccacagt ttcacttctg cacctaacct gggtcaggtc cttctgtccg 60

gacactgttg acgcgcagtc agctcttacc cccattgggt ggcgcgatca cccaagaacc 120

aatcagtgtc gccgcggacg ctggatataa agtccacgca gcccgcagaa ctcagaagtc 180

45 **gcgaatcgcc gacaggtgcg 200**

50 <210> 28
<211> 200
<212>ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

55 <400> 28

ES 2 798 751 T3

gtaaggagag tgtgggtgca gagctgggggt cagggaaagc tggagctttc tgcagaccct 60
 gagctgctca gggctgagag ctggggatcat gaccctcacc ttcatttctt gtacctgtcc 120
 ttcccagagc ctctccatc cactgtctcc aacatggcga ccgttgctgt tctggttgtc 180
 cttggagctg caatagtcac 200

5 <210> 29
 <211> 149
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético
 <400> 29

agtgtgcgcg cggacgctgg atataaagtc cacgcagccc gcagaactca gaagtcgcca 60
 atcgccgaca ggtgcgatgg ccgtcatggc gccccgaacc ctogtcctgc tactctcggg 120
 ggctctggcc ctgaccacaga cctggggcgg 149

15 <210> 30
 <211> 159
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintético
 <400> 30

gggtggtgcct tctggacagg agcagagata cacctgccat gtgcagcatg agggtttgcc 60
 caagcccctc accctgagat ggggtaagga gagtgtgggt gcagagctgg ggtcagggaa 120
 agctggagct ttctgcagac cctgagctgc tcagggctg 159

30 <210> 31
 <211> 27
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

35 <400> 31
 agtccttcag cctccactca ggtcagg 27

40 <210> 32
 <211> 25
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

45 <400> 32
 taccaccagt acgcctacga cggca 25

50 <210> 33
 <211> 18

ES 2 798 751 T3

<212>ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Sintético

<400> 33

atcctgtacc agagagtg

18

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar un animal no humano modificado genéticamente, que comprende:

- 5 reemplazar en un locus del CMH II no humano endógeno una(s) secuencia(s) de nucleótidos que codifica(n) un complejo CMH II no humano con una(s) secuencia(s) de nucleótidos que codifica(n) un complejo CMH II humano/no humano quimérico que comprende (i) polipéptido α del CMH II humano/no humano quimérico que tiene dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del CMH II de un polipéptido α del CMH II humano y (ii) polipéptido β del CMH II humano/no humano quimérico, que tiene dominios $\beta 1$ y $\beta 2$ del CMH II humano de un polipéptido del CMH II humano para generar una primera célula madre embrionaria (ES), en donde la porción no humana del polipéptido α del CMH II quimérico comprende dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido α del CMH II no humano endógeno y en donde la porción no humana del polipéptido β del CMH II quimérico comprende dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido β del CMH II no humano endógeno, en donde la primera célula ES comprende una secuencia de nucleótidos que codifica polipéptido del CMH I humano/no humano quimérico; o
- 10 reemplazar en un locus del CMH I no humano endógeno una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del CMH I humano/no humano quimérico que comprende dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ humanos de un polipéptido del CMH I humano para generar una segunda célula ES, en donde la porción no humana del polipéptido del CMH I quimérico comprende dominios transmembrana y citoplásmicos de un polipéptido del CMH I no humano endógeno, en donde la segunda célula ES comprende una(s) secuencia(s) de nucleótidos que codifica(n) un complejo CMH II humano/no humano quimérico; y
- 15 generar un animal no humano a partir de la primera o la segunda célula madre embrionaria.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en donde las etapas de reemplazar secuencias de nucleótidos comprenden recombinación homóloga en la célula ES.
- 30 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el animal no humano no expresa sobre una superficie celular polipéptidos de CMH I, α II y/o β II endógenos clásicos funcionales a partir del locus del CMH no humano endógeno.
- 35 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la(s) secuencia(s) de nucleótidos que codifica(n) un complejo CMH humano/no humano quimérico y/o la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido del CMH I humano/no humano quimérico están unidas operativamente a elementos reguladores no humanos endógenos.
- 40 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido del CMH I humano se selecciona entre el grupo que consiste en HLA-A, HLA-B y HLA-C.
- 45 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el animal no humano comprende adicionalmente en un locus de $\beta 2$ microglobulina no humana endógena una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado, en donde el animal expresa el polipéptido de $\beta 2$ microglobulina humano o humanizado.
- 50 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido α del CMH II humano quimérico es codificado por un gen de HLA de clase II humano seleccionado entre el grupo que consiste en cualquier gen de cadena α de HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP; y en donde el polipéptido β del CMH II humano es codificado por un gen de HLA de clase II humano seleccionado entre el grupo que consiste en cualquier gen de cadena β de HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP.
- 55 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el animal no humano es un roedor, tal como un ratón o una rata.
9. El método de la reivindicación 8, en donde el roedor es un ratón.
10. El método de la reivindicación 9, en donde el polipéptido del CMH I no humano endógeno deriva de H-2K, H-2D o H-2L.
- 60 11. El método de la reivindicación 9, en donde el polipéptido α del CMH II no humano endógeno es codificado por un gen de clase II de ratón seleccionado entre el grupo que consiste en cualquier gen de cadena α de H-2E y H-2A y el polipéptido β del CMH II no humano es codificado por un gen de clase II de ratón seleccionado entre el grupo que consiste en cualquier gen de cadena β de H-2E y H-2A.
- 65 12. El método de la reivindicación 9, en donde el ratón expresa proteínas de HLA-A/H-2K y HLA-DR/H-2E.

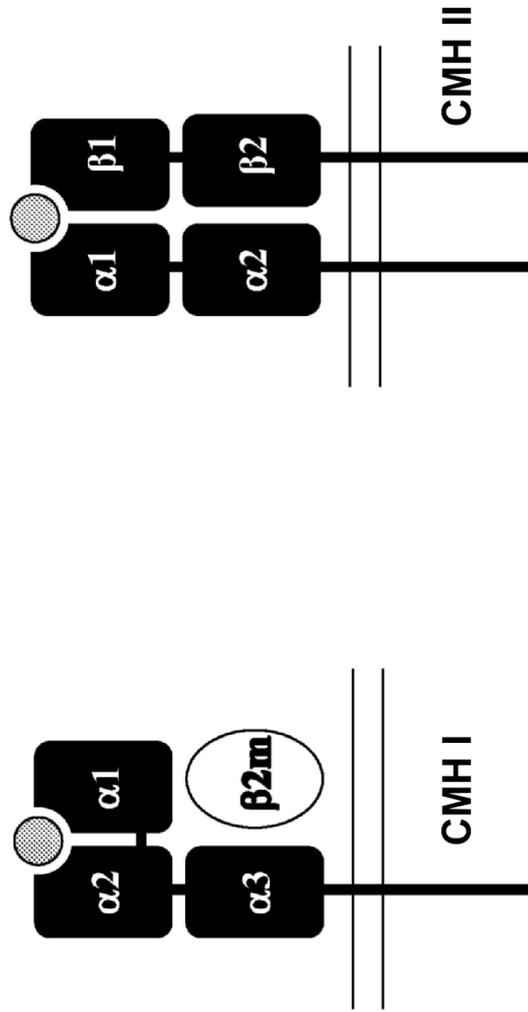


FIG. 1

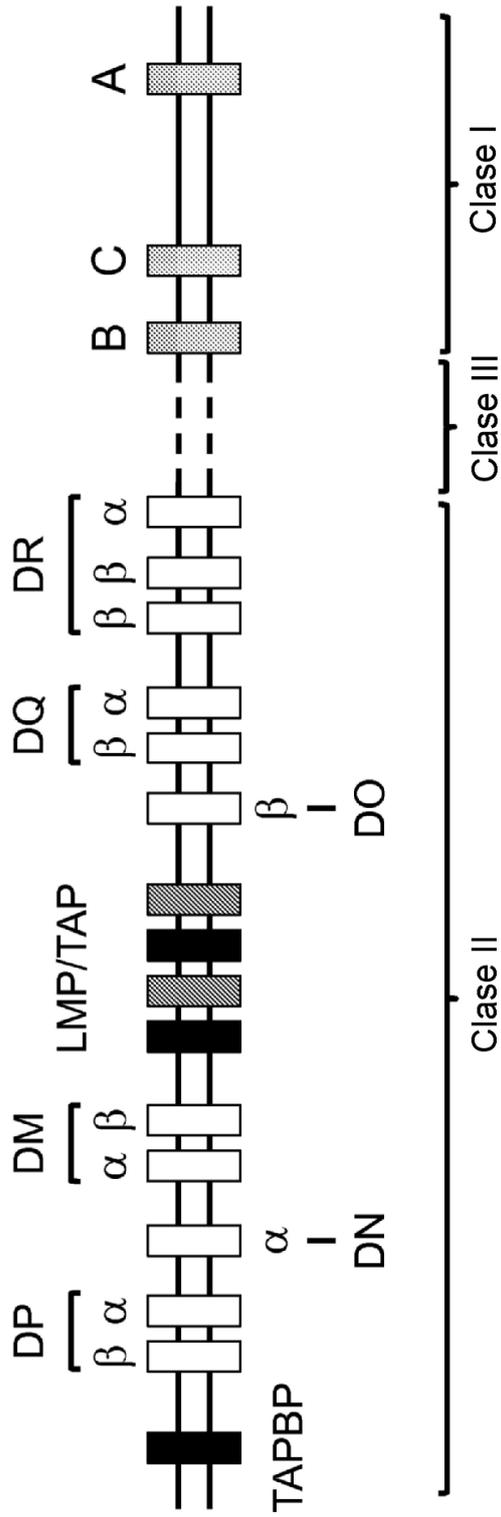


FIG. 2

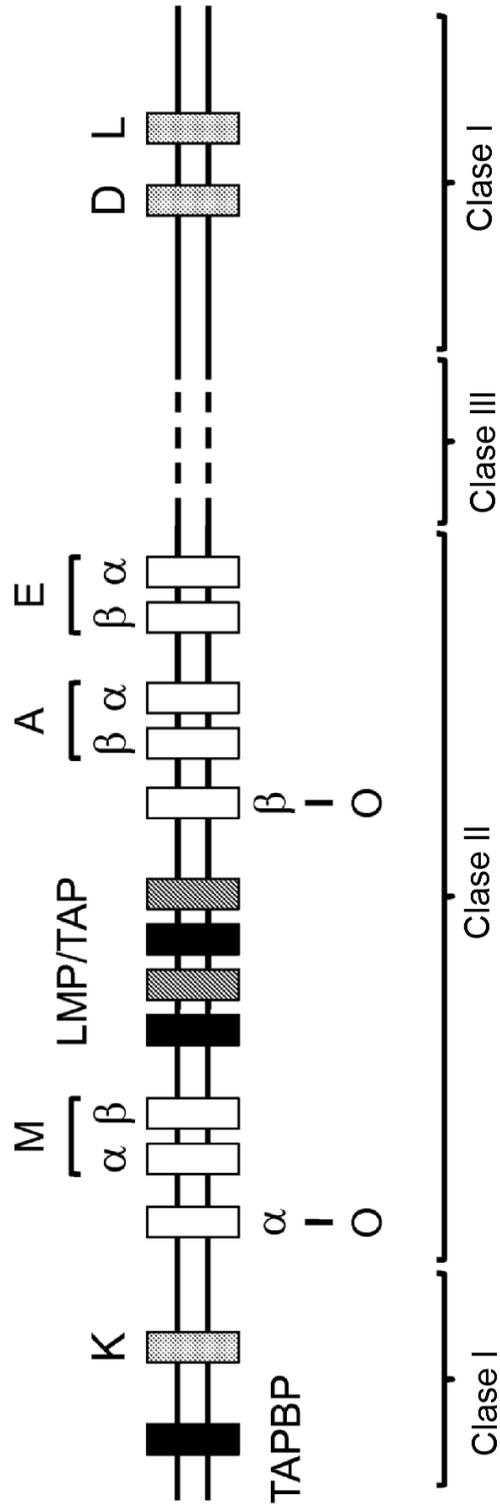


FIG. 3



H2-K+/1666 CMH-II+/1681

FIG. 4

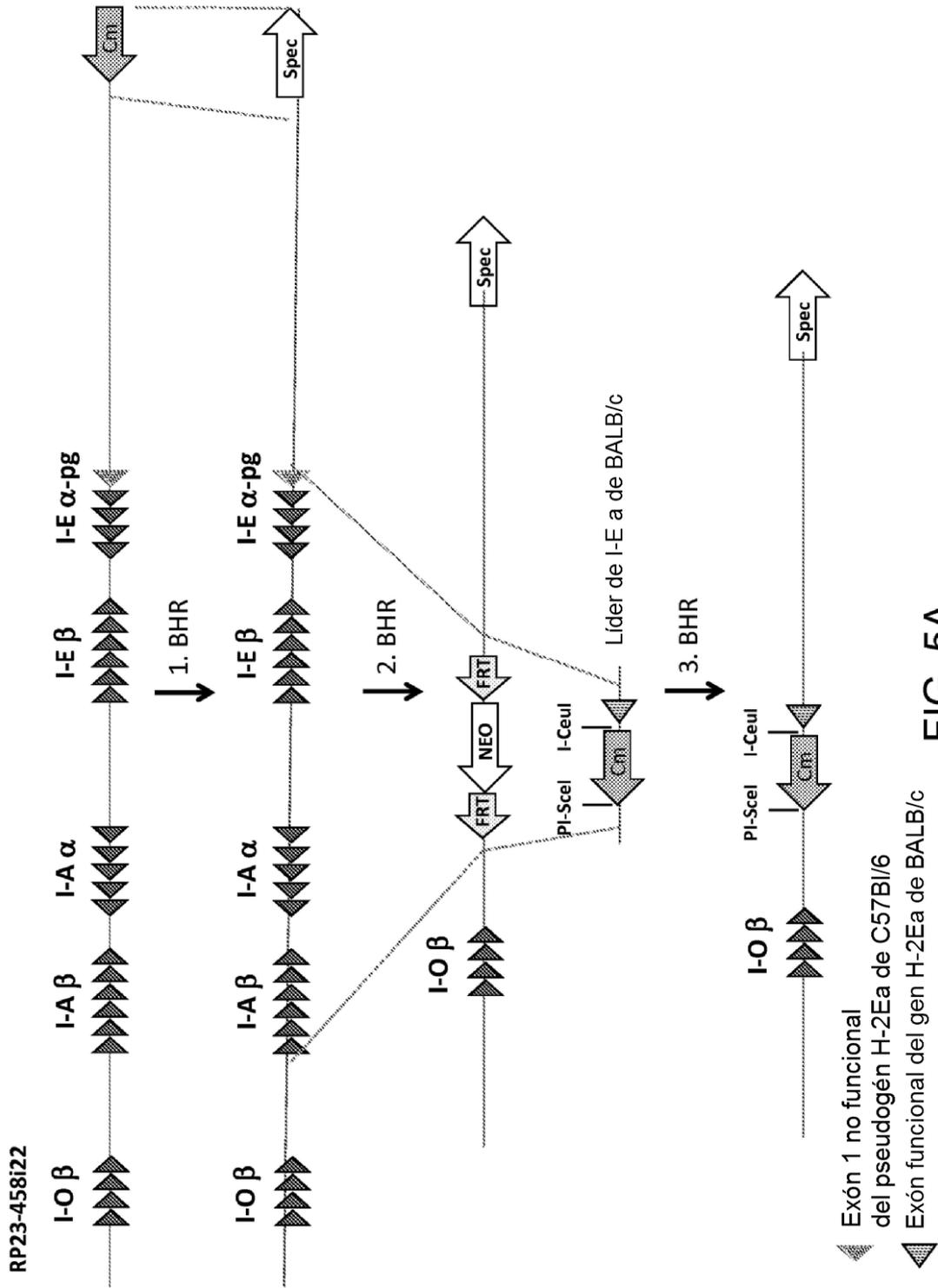


FIG. 5A

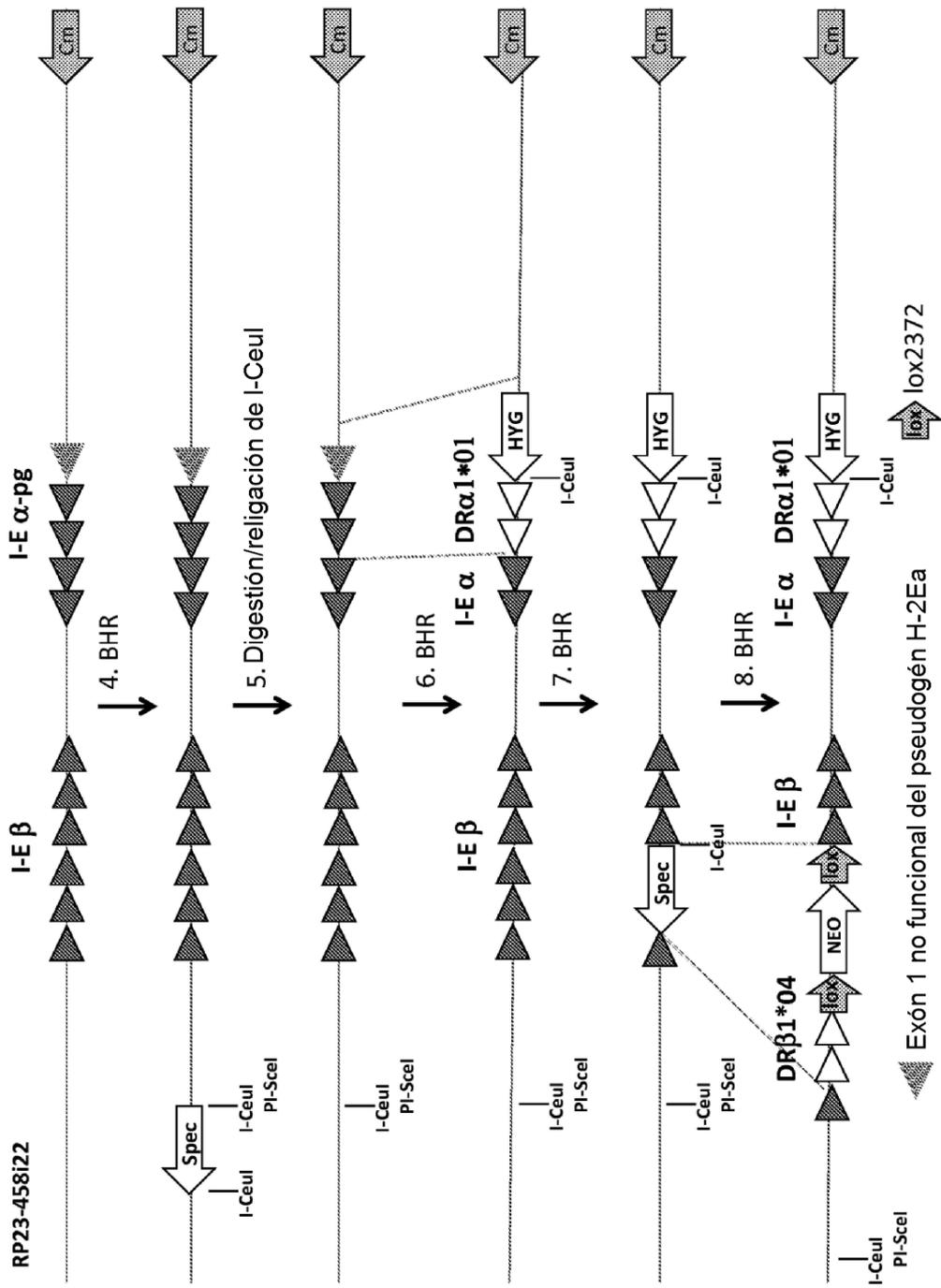


FIG. 5B

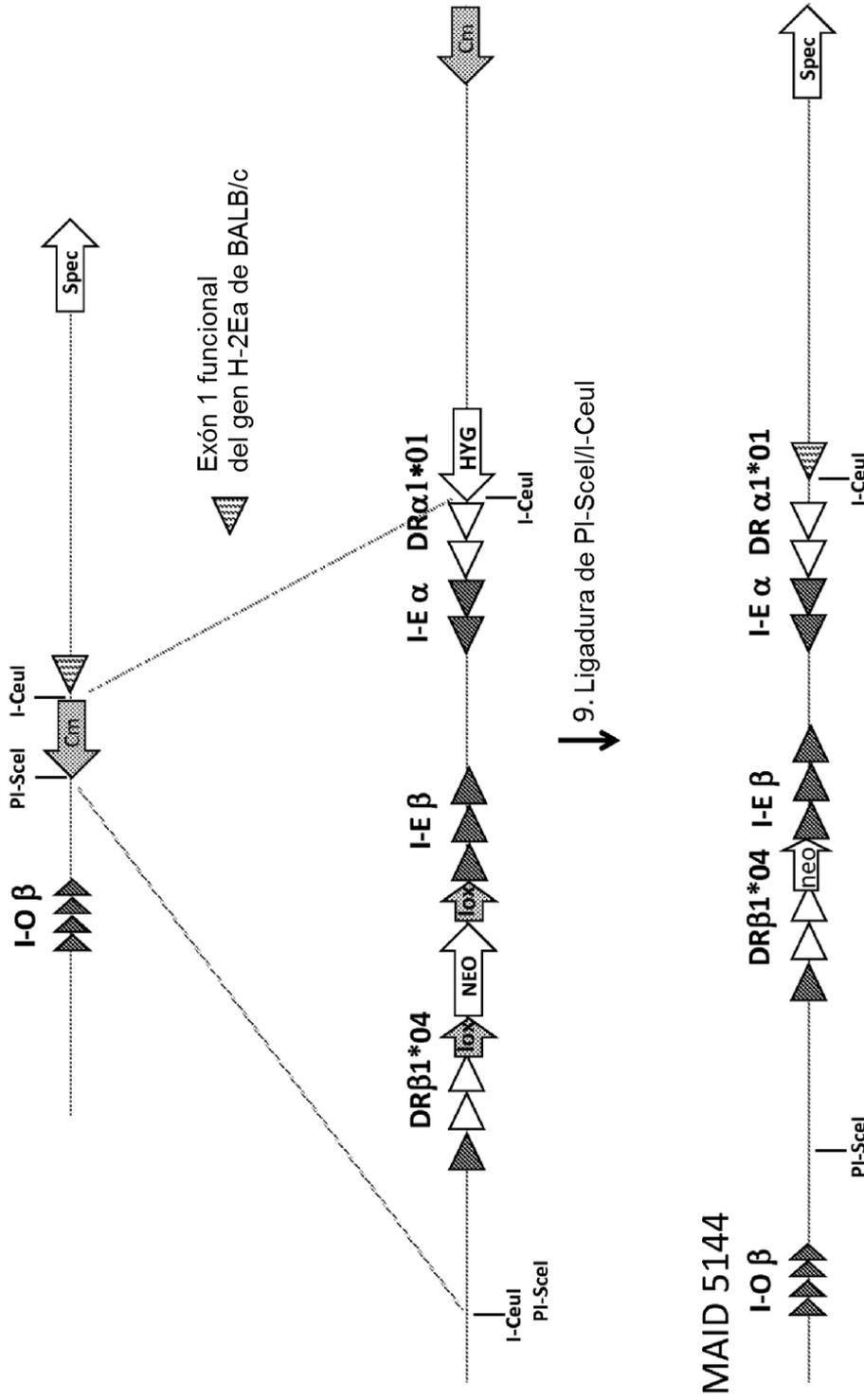


FIG. 5C

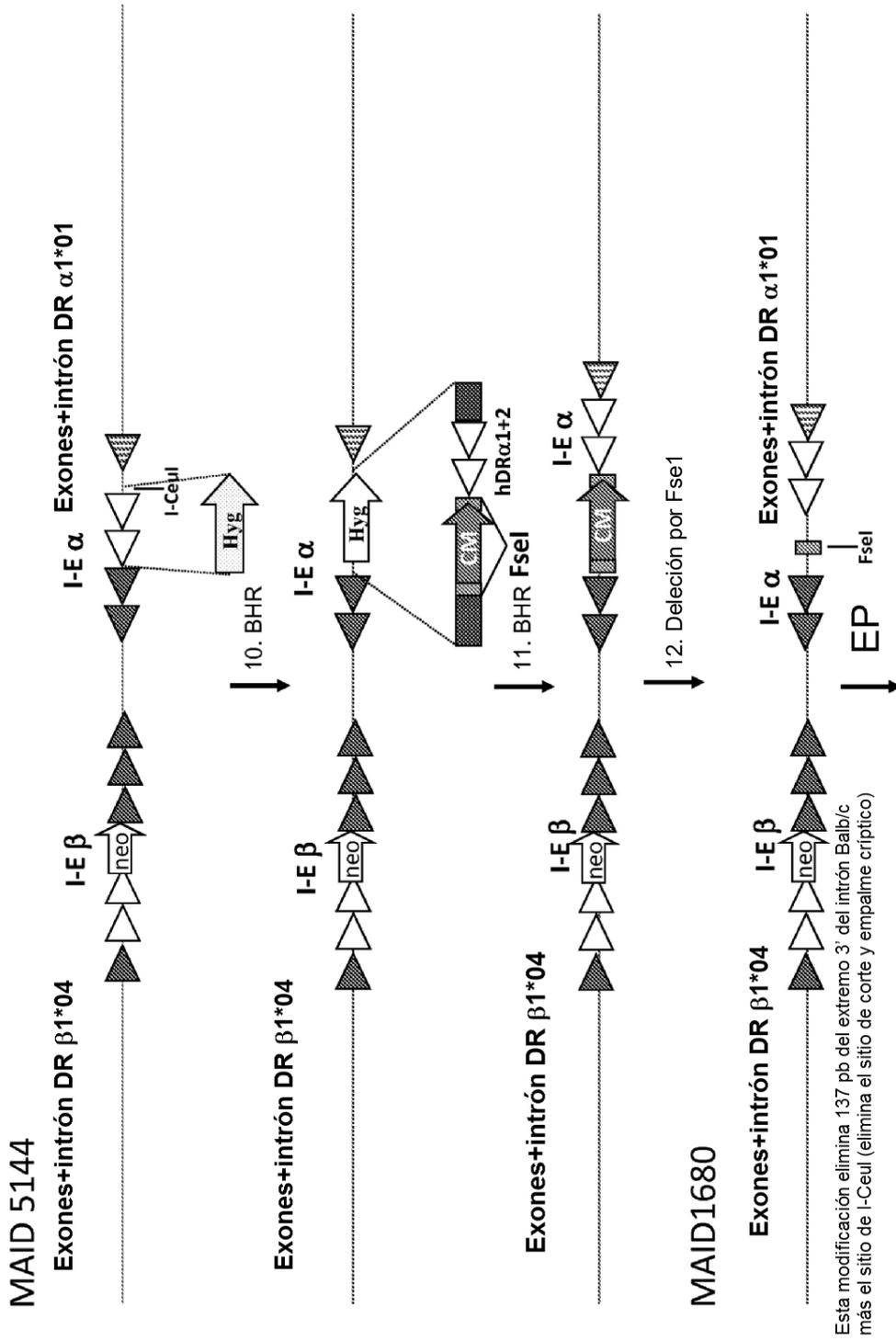


FIG. 5D

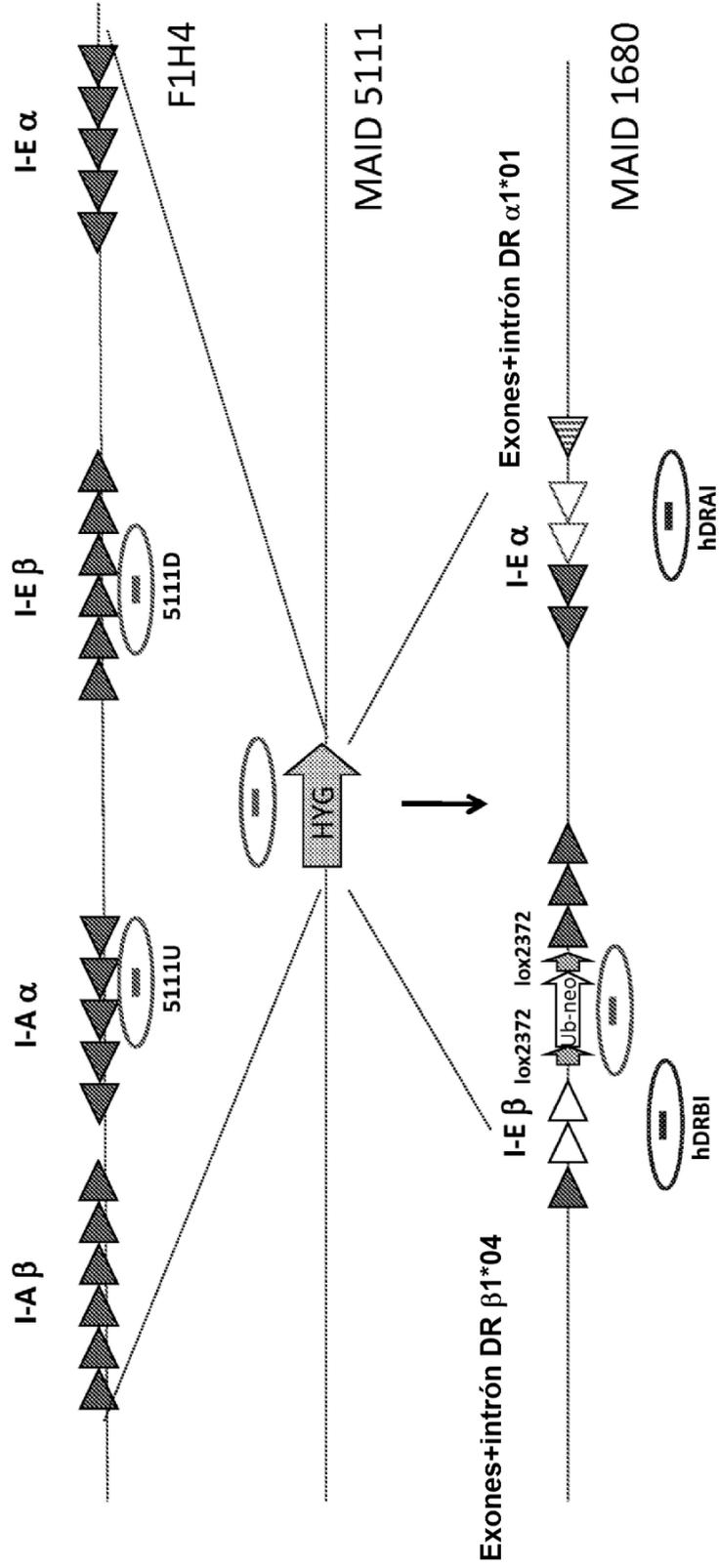


FIG. 6

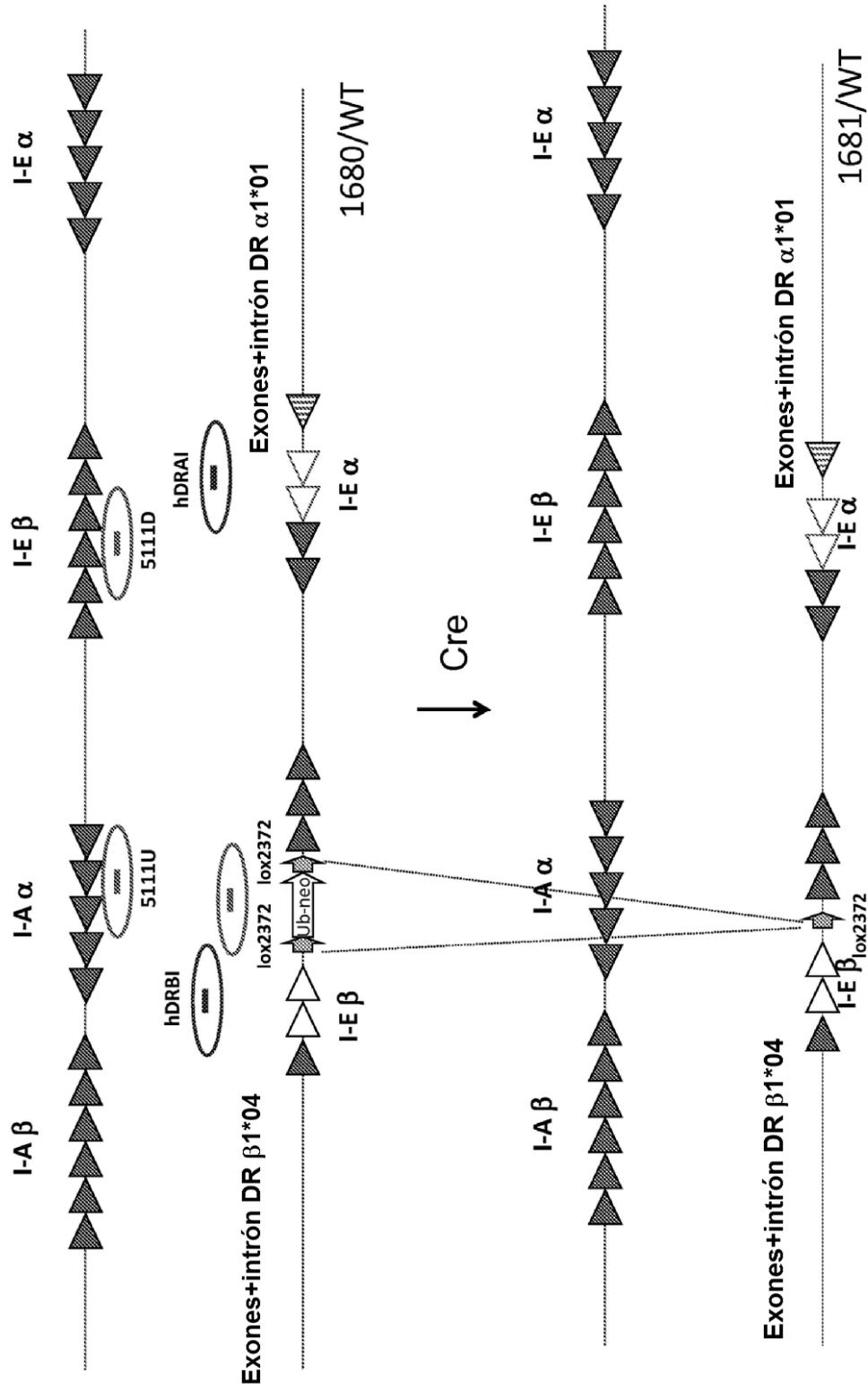


FIG. 7

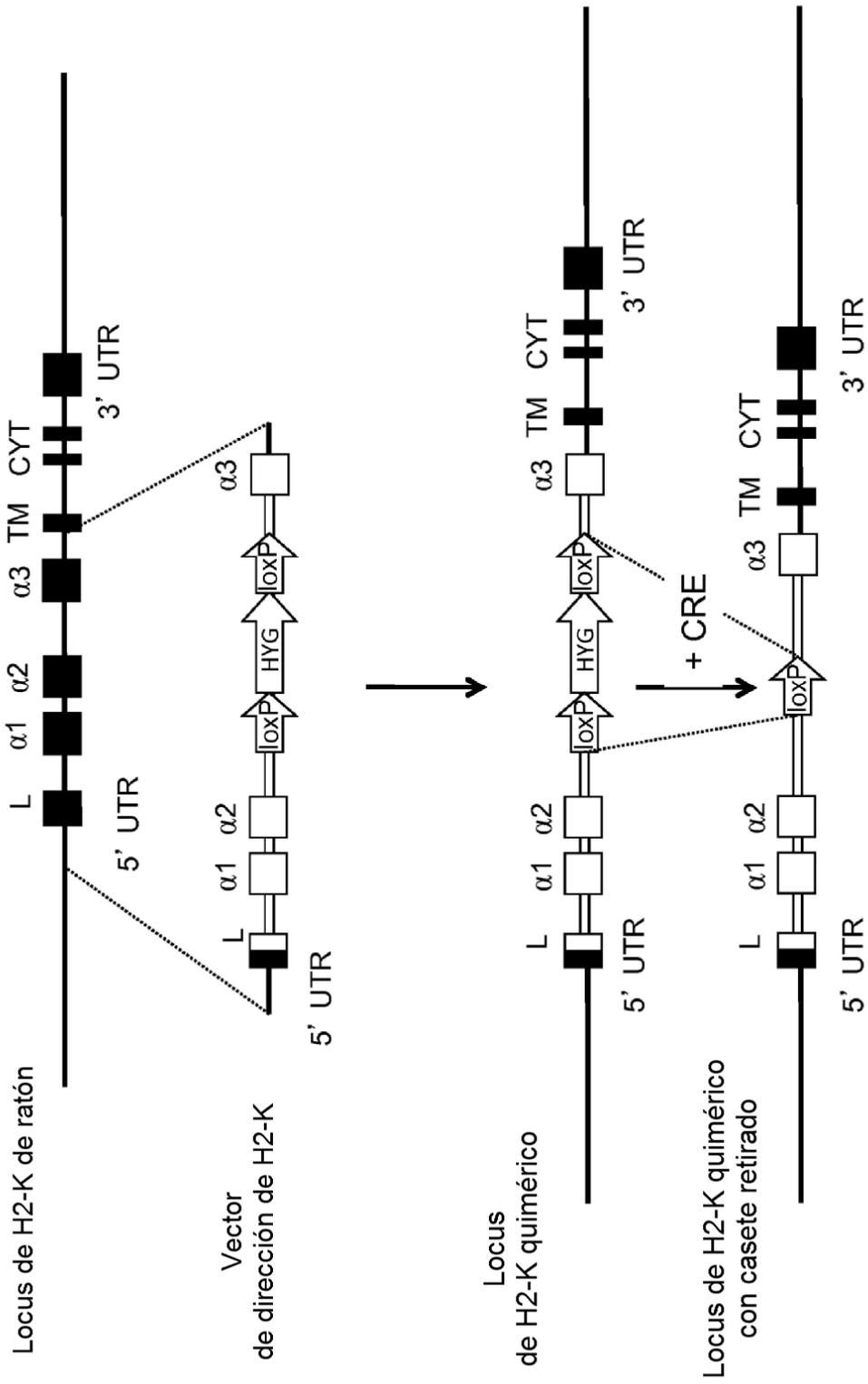


FIG. 8

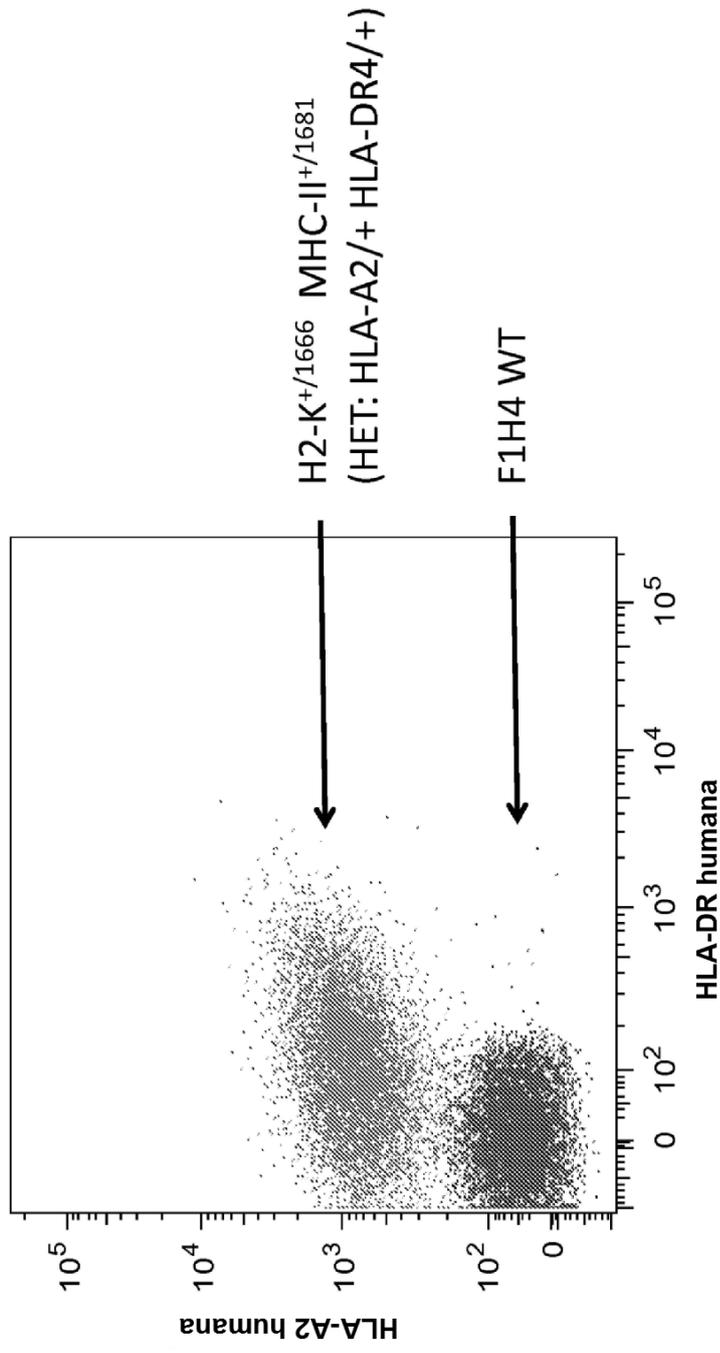


FIG. 9